



BET-hämmare för behandling av klarcellig äggstockscancer

Rebecka Holmnäs

223996.0 Pro gradu-avhandling i cellbiologi, 40 sp

Utbildningsprogrammet i biovetenskap

Fakulteten för naturvetenskaper och teknik

Åbo Akademi

2019

Handledare:

John E. Eriksson

Praktiska handledare:

Julia Lindqvist

Förord

Detta arbete är en del av ett samarbetsprojekt mellan Åbo Akademi och Orion Pharma, därför vill jag först frambära ett varmt tack till min handledare John Eriksson och Orion Pharma som gett mig möjligheten att avlägga mitt pro gradu-arbete inom detta banbrytande projekt. John Eriksson är en sakkunnig och motiverande mentor, vars kunskap jag haft äran att ta del av. Jag vill även framföra ett stort tack till Julia Lindqvist som med sin utstrålade positivitet varit en uppmuntrande, tålmodig och hjälpsam praktisk handledare – speciellt under påbörjandet och slutförandet av detta projekt. Jag vill tacka mina handledare och Erik Niemelä som gett goda råd för presentation av mitt data. Jag vill även tacka Leila Rato som frivilligt gått igenom material för mitt muntliga framförande och därefter gett goda råd på förbättrande för en mer publikvänlig presentation. Slutligen vill jag rikta ett varmt tack till Alia Joko, som varit ett stort stöd för mig under denna process, och andra medlemmar i John Erikssons och Lea Sistonens forskningsgrupper för en vänlig atmosfär och intressanta och inspirerande diskussioner.

Flera års tålmodigt arbete har krävts för att ta mig till denna milstolpe. Färden har innehållit om än många känslor från frustration till entusiasm och glädje samt med- och motgångar. Färden vore tung utan stöttande medmänniskor. Därför vill jag rikta ett speciellt tack till alla som stöttat och uppmuntrat mig under dessa år; jag tackar speciellt min familj som även hjälpt mig med flytten till och underlättat mitt liv i Åbo. Jag vill tacka mina vänner som jag fått dela mitt studieliv med, däribland det kamratstöd jag fått och sällskap vid de evenemang vi deltagit i. Jag vill även tacka min kära pojkvän Joni för hans lugnande verkan och förgyllande av mitt liv.

Jag märkte redan i ett tidigt skede av mina studier att biovetenskap med inriktning på sjukdomar hos människan är den vetenskap jag brinner för. Jag är tacksam över att ha fått en intressant och högklassig utbildning i detta ämne och att ha fått ta del av betydelsefull forskning vid Åbo Akademi. Slutförandet av detta arbete utmärker slutet på min studietid vid Åbo Akademi men detta är endast ett av livets många milstolpar. Hädanefter ser jag med förväntan på framtiden, både karriärmässigt och med tanke på allt som biovetenskapen kan åstadkomma.

ÅBO AKADEMI

Utbildningsprogrammet i biovetenskap
Rebecka Holmnäs, 2019

BET-hämmare för behandling av klarcellig äggstockscancer

Pro-gradu-avhandling, 105 sidor

Nyckelord: Personlig medicin, epigenetik, ARID1A, SWI/SNF, BRD2, BRD4, histonmodifieringar, cancer

ABSTRAKT

Klarcellig äggstockscancer (eng. ovarian clear cell carcinoma, OCCC) är en ovanlig cancerform för vilken överlevnadsgraden är låg eftersom behandlingen inte har förbättrats på tiotals år. Sekvenseringsstudier har visat att *ARID1A* är muterad i 50 % av fallen. ARID1A ingår i det ATP-beroende nukleosomremodelleringskomplexet SWI/SNF, som omordnar nukleosomstrukturen till exempel för att göra DNA tillgängligt för transkription. BET-proteiner, som binder till acetylerade histoner, är viktiga reglerare av transkription. Dessa kallas därför ibland för epigenetiska avläsare. Målet med detta arbete är att undersöka ifall hämmare av BET-proteiner kan specifikt stoppa tillväxten av *ARID1A*-muterad OCCC samt att ta reda på vilket BET-protein som står för den terapeutiska effekten. För dessa ändamål har dos-respons-experiment med BET-hämmare, där *ARID1A*-muterade cellinjer har jämförts med vildtypscellinjer, och western blott på BRD2 och BRD4 utförts. Inga uteslutande resultat erhöles, eftersom en av två vildtypscellinjer (RMG-1 och ES-2) var rätt så känslig mot hämningen. Dessutom visade TOV21G, en av de tre muterade cellinjerna (TOV21G, OVTOKO, OVMANA), resistens mot hämningen. Däremot var OVTOKO och OVMANA speciellt känsliga. Utgående från BRD2- och BRD4-proteinnivåerna kunde inte skillnaderna i känslighet förklaras. Fortsatta undersökningar är befogade, speciellt för att undersöka BRD3:s roll och eventuell sammutation av *ARID1A* och *PIK3CA*, varvid en kombination av BET-hämmare och PI3K-hämmare kunde vara en potentiell behandlingsform för denna typ av cancer.

ÅBO AKADEMI UNIVERSITY
Master's Programme in Biosciences
Rebecka Holmnäs, 2019

BET-inhibitors for the Treatment of Ovarian Clear Cell Carcinoma

Pro gradu thesis, 105 pages

Keywords: Personalized medicine, Epigenetics, ARID1A, SWI/SNF, BRD2, BRD4, histone modifications, cancer

ABSTRACT

Ovarian clear cell carcinoma, OCCC, is a rare type of cancer for which the survival rate is low due to no improvement in the treatment during the past decades. Sequencing studies have shown that *ARID1A* is mutated in 50% of OCCC cases. ARID1A is a component of the SWI/SNF nucleosome remodeling complex that for instance modulates the nucleosome structure available for the transcriptional machinery. BET proteins bind to acetylated histones and function as important regulators of transcription. They are commonly called epigenetic readers. The aim of this thesis was to study whether BET inhibitors can specifically arrest the growth of *ARID1A* mutated OCCC and to uncover which of the BET proteins is responsible for the therapeutic effect. To meet the aim, dose-response experiments where *ARID1A* mutated cell lines have been compared with wildtype cell lines and western blot on BRD2 and BRD4 have been conducted. No univocal results were obtained since one of two wildtype cell lines (RMG-1 and ES-2) was shown to be fairly responsive to BET inhibition. Additionally, among the three mutated cell lines TOV21G was resistant to the inhibition compared with the highly responsive OVTOKO and OVMANA. The differences in sensitivity could not be explained by BRD2 and BRD4 protein levels. Further studies are warranted especially on BRD3 and possible *ARID1A-PIK3CA* co-mutation for which a combination of a BET inhibitor and PI3K inhibitor could be a probable treatment option.

Innehållsförteckning

Förkortningar

| | |
|---|----|
| 1. Introduktion | 1 |
| 2. Litteraturoversikt | 3 |
| 2.1 Cancer | 3 |
| 2.1.1 Cancerns uppkomst | 3 |
| 2.1.2 Cancerns epidemiologi | 4 |
| 2.1.3 Äggstockscancerns epidemiologi | 5 |
| 2.2 Dynamisk organisering av DNA i kromosomer | 9 |
| 2.2.1 DNA- och kromosomstruktur | 9 |
| 2.3 Reglering av kromatin | 11 |
| 2.3.1 DNA-metylering | 11 |
| 2.3.2 Histonmodifieringar | 12 |
| 2.3.3 Histonacetyleringens inverkan på cellulära funktioner | 12 |
| 2.3.4 ATP-beroende nukleosomremodelleringskomplex | 13 |
| 2.4 Gener och proteinsyntes | 14 |
| 2.4.1 Gener hos eukaryoter och cellens hantering av dem | 14 |
| 2.4.2 Transkription – från DNA till pre-mRNA | 15 |
| 2.5 SWI/SNF-komplex | 17 |
| 2.5.1 ARID1A-mutationer i OCCC | 18 |
| 2.6 BET-proteinfamiljen | 22 |
| 2.6.1 BRD2 | 22 |
| 2.6.2 BRD3 | 23 |
| 2.6.3 BRD4 | 24 |
| 2.6.4 BET-proteiner, SWI/SNF-komplex och cancer | 25 |
| 2.7 BET-hämmare för behandling av cancer | 27 |

| | |
|--|----|
| 3. Målsättning..... | 30 |
| 4. Material och metoder | 32 |
| 4.1 Cellkultur | 32 |
| 4.1.1 Cellinjer..... | 32 |
| 4.1.2 Behandlingar | 34 |
| 4.1.3 Incucyte Zoom..... | 35 |
| 4.1.4 WST-1 | 36 |
| 4.1.5 MTT | 37 |
| 4.1.6 Transfektion | 37 |
| 4.2 Western blott..... | 39 |
| 4.2.1 Cellysering | 39 |
| 4.2.2 Natriumdodekylsulfatpolyakrylamidgelelektrofores (SDS-PAGE) och immunoblotting..... | 40 |
| 4.3 Statistik | 42 |
| 5. Resultat..... | 43 |
| 5.1 Skillnader mellan viabilitetsmetoderna MTT och WST-1 | 43 |
| 5.2 WST-1 fungerade inte som metod för att klarlägga viabiliteten hos OVTOKO..... | 45 |
| 5.3 <i>ARID1A</i> -mutation påverkar inte enskilt känsligheten för BET-hämmare.... | 46 |
| 5.3.1 De muterade cellinjerna OVTOKO och OVMANA är betydligt känsligare för BET-hämmarna än TOV21G och vildtypscellinjerna | 46 |
| 5.4 Nedreglering av <i>ARID1A</i> hos vildtypscellinjen ES-2..... | 63 |
| 5.5 BRD2 och BRD4 ger ingen antydning om känslighet för BET-hämmare.. | 68 |
| 5.6 <i>ARID1A</i> finns i högre mån i ES-2 än RMG-1 | 68 |
| 6. Diskussion | 70 |
| 6.1 Jämförelse av viabilitetsmetoderna MTT och WST-1..... | 71 |
| 6.2 Dos-respons-experiment..... | 72 |

| | |
|---|----|
| 6.2.1 <i>ARID1A</i> -mutation förutbestämmer inte känsligheten för BET-hämmare i OCCC..... | 72 |
| 6.2.2 RMG-1 uppvisar tydliga morfologiska förändringar under BET-hämning..... | 74 |
| 6.2.3 Nedreglering av ARID1A hos vildtypscellinjen ES-2 | 75 |
| 6.2.4 Möjliga orsaker till den avvikande känsligheten för BET-hämmare oberoende av <i>ARID1A</i> -mutationsstatus | 77 |
| 6.3 Kliniska studier och framtida visioner | 80 |
| 7. Sammanfattning | 81 |
| Bilagor..... | 82 |
| Bilaga 1 | 82 |
| Litteraturförteckning | 83 |

Tabeller:

| | |
|---|----|
| Tabell 1: Subenheter som förekommer i olika SWI/SNF-komplex | 18 |
| Tabell 2: De <i>ARID1A</i> -mutanta cellinjernas odlingsmedium och ursprung..... | 33 |
| Tabell 3: Vildtypscellinjernas odlingsmedium och ursprung | 33 |
| Tabell 4: Nocodazole-koncentrationen och cellantalet per brunn i 96-brunnsplatta som använts för de olika cellinjerna | 34 |
| Tabell 5: Primära antikroppar för western blott..... | 40 |
| Tabell 6: Sekundära antikroppar för western blott..... | 41 |
| Tabell 7: Rangordning och jämförelse av beräknade IC50-värden för JQ1 detta arbete och studien av Berns et al. (2018)..... | 73 |

Förkortningar

| | |
|----------------------|--|
| ac | Acetylering |
| ALDH | Aldehyddehydrogenas |
| ARID1A | Adenin–tymin-rikt interaktivt domäninnehållande protein 1A |
| ATCC | eng. American Type Culture Collection |
| ATP | Adenosintrifosfat |
| BET | Bromodomän och extraterminal proteinfamilj |
| BRD2, 3, 4 | Bromodomän 2, 3, 4 |
| BRG | Brahma-relaterad gen |
| BRM | Brahma |
| CpG | Cytosin–guaninbaspar |
| CTD | C-terminal domän |
| DMSO | Dimetylsulfoxid |
| DNA | Deoxyribonukleinsyra |
| ECL | Förstärkt kemiluminescent substrat |
| EDTA | Etylendiamintetraättiksyra |
| EMT | Epitelial–mesenkymalövergång |
| FAK | Fokalvidhäftningskinas, eng. focal adhesion kinase |
| FGF2 | Fibroblasttillväxtfaktor 2 |
| FIGO | Inofficiellt: Internationell förening för gynekologi och obstetrik. Officiellt (eng.): International Federation of Gynecology and Obstetrics |
| GLTSCR1 | Glioma tumörsuppressor region gen 1 |
| GTF | Allmän transkriptionsfaktor |
| H1, H2A, H2B, H3, H4 | Histon 1, 2A, 2B, 3, 4 |
| HAT | Histonacetyltransferas |
| HDAC | Histondeacetylas |
| HEXIM1 | Hexametylen-bisacetamid-inducerbar-1 |

| | |
|----------------|---|
| HRP | Pepparrotsperoxidaskonjugerade, eng. Horseradich peroxidase conjugated |
| IC50 | Halv maximal hämmande koncentration |
| IL-6 | Interleukin-6 |
| JCRB Cell Bank | eng. Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank |
| JMJD6 | Arginin-demetylas och lysin-hydroxylas |
| K | Lysin |
| me | Metylering |
| MECP2 | metyl-CpG-bindande protein 2 |
| MTT | Tiazolylblåtetrazoliumbromid |
| Mut. | Muterad |
| nM | Nanomolar |
| nm | Nanometer |
| OCCC | Klarcellig äggstockscancer |
| PARP | Poly-(ADP-ribos)-polymeras |
| PBST | Fosfatbuffrad saltlösning med 0,1 % Tween 20, eng. Phosphate buffered saline with Tween 20 |
| PDX | Primär xenograftmodell (eng. patient derived xenograft) |
| pH | Potentiellt väte |
| PI3K | Phosphatidylinositol-4,5-bisfosfat-3-kinas |
| PIC | Preinitieringskomplex |
| PIK3CA | Phosphatidylinositol-4,5-bisfosfat-3-kinas katalytisk subenhet alfa-isoform |
| PP2R1A | Serin–treonin proteinfosfatasets regulatoriska subenhet |
| pre-mRNA | Prekursor-meddelande-ribonukleinsyra |
| PTEFb | Positiv transkriptionselongeringsfaktor b-komplex |
| RPMI 1640 | Roswell Park Memorial Institute 1640-medium |
| SEM | Medelvärdets medelfel, eng. Standard error of the mean |
| sEOC | Serös epitelial äggstockscancer |
| siRNA | RNA-molekyler som hämmar mRNA (eng. small interfering RNA) |
| SWI/SNF | SWItch/Sukros-icke-fermenterbar-komplex |
| TATA-box | Adenin–tyminrik promotor |

| | |
|--------|---|
| TERT | Telomerasomvändtranskriptas, eng. telomerase reverse transcriptase |
| TF | Transkriptionsfaktor |
| TOPBP1 | DNA–topoisomeras-2-bindande protein 1 |
| tRNA | Transfer-RNA |
| TWIST | Twist-relaterad protein |
| WEE1 | WEE1-lik proteininkinase |
| WST-1 | Vattenlösigt tetrazoliumsalt-1, eng. Water soluble tetrazolium salt 1 |
| VT | Vildtyp |

1. Introduktion

Celler lever sedvanligt i harmoni då homeostas råder. Homeostas är på sätt och vis ett stabilt tillstånd där endast små uthärdliga fluktuationer förekommer i cellernas inre miljö, sådana fluktuationer kan vara till exempel små temperatur- och pH-förändringar eller små förändringar i vatten- och jonbalans (Cannon, 1929). Celler anpassar sig besynnerligen bra till sina yttre och inre förhållanden genom att reagera på förändringar i dessa, vilket möjliggör homeostas (Cannon, 1929). Däremot när celler förlorar kontrollen över homeostasen kan cancer uppstå; till exempel är kronisk inflammation, där det råder en fortgående obalans av inflammatoriska markörer såsom cytokiner, förknippat med cancer (Coussens & Werb, 2002; Sokolosky & Wargovich, 2012).

År 2015 var cancer den ledande orsaken till mortalitet hos personer under 70 år i västvärlden (Bray et al., 2018). I och med utvecklingsländers kulturutveckling mot västvärlden, är cancer den största sjukdomsgruppen vars behandling bör förbättras för att öka livslängden i alla världens länder under 2000-talet (Bray et al., 2018; Sokolosky & Wargovich, 2012). Äggstockscancer är globalt den sjunde mest diagnosticerade cancer hos kvinnor (Reid, Permuth, & Sellers, 2017; Torre, Islami, Siegel, Ward, & Jemal, 2017). I Finland ligger överlevnadsgraden i denna cancerform fortfarande vid endast 40 % (Suomen Syöpärekisteri, 2019). Därtill är klarcellig äggstockscancer (eng. ovarian clear cell carcinoma, OCCC) en ovanlig typ av äggstockscancer, som är än svårare att behandla (Reid et al., 2017). Ingen specifik behandling finns tillgänglig för denna tumörtyp och dess cancerceller har visats förvärva resistens mot den nuvarande behandlingen (Banerjee & Kaye, 2013; Zhang et al., 2016).

ARID1A, vars proteinprodukt förekommer i nukleosomremodelleringskomplexen, är muterad i 50 % av OCCC-fallen (Jones et al., 2010; Wiegand et al., 2010). *ARID1A*-mutationer leder oftast till att ett inaktivt protein translateras (Jones et al., 2010). En studie med nedreglerat *ARID1A* har påvisat ett förändrat uttryck hos hundra gener på grund av förändringar i histonmodifieringar, däribland histonacetylering (Lakshminarasimhan et al., 2017).

BET-hämmare hämmar bromodomän 2, 3 och 4 (BRD2, BRD3, BRD4) som ingår i bromodomän- och extraterminal proteinfamiljen (eng. Bromodomain and extra-

terminal, BET) (Dey, Chitsaz, Abbasi, Misteli, & Ozato, 2003; LeRoy, Rickards, & Flint, 2008). Dessa proteiner binder till acetylerade lysinrester på histoner och avläser en histonkod, dvs. olika kombinationer av histonmodifieringar (Dey et al., 2003; Kanno et al., 2004; LeRoy et al., 2008; Loyola & Almouzni, 2004). De kan sedan rekrytera centrala proteinkomplex för transkription av vävnadsspecifika gener (Wang & Filippakopoulos, 2015).

Eftersom både BET-proteiner och intakt ARID1A är viktiga för ändamålsenlig transkription av gener, undersöks i detta arbete BET-hämmarnas verkan på *ARID1A*-muterad OCCC. Därvid är syftet med detta arbete att undersöka ifall BET-hämmare kunde specifikt stoppa tillväxten av *ARID1A*-muterad OCCC. Resultaten från detta arbete kan eventuellt föra den medicinska vetenskapen ett steg närmare personlig medicin och bättre vård av patienter.

2. Litteraturöversikt

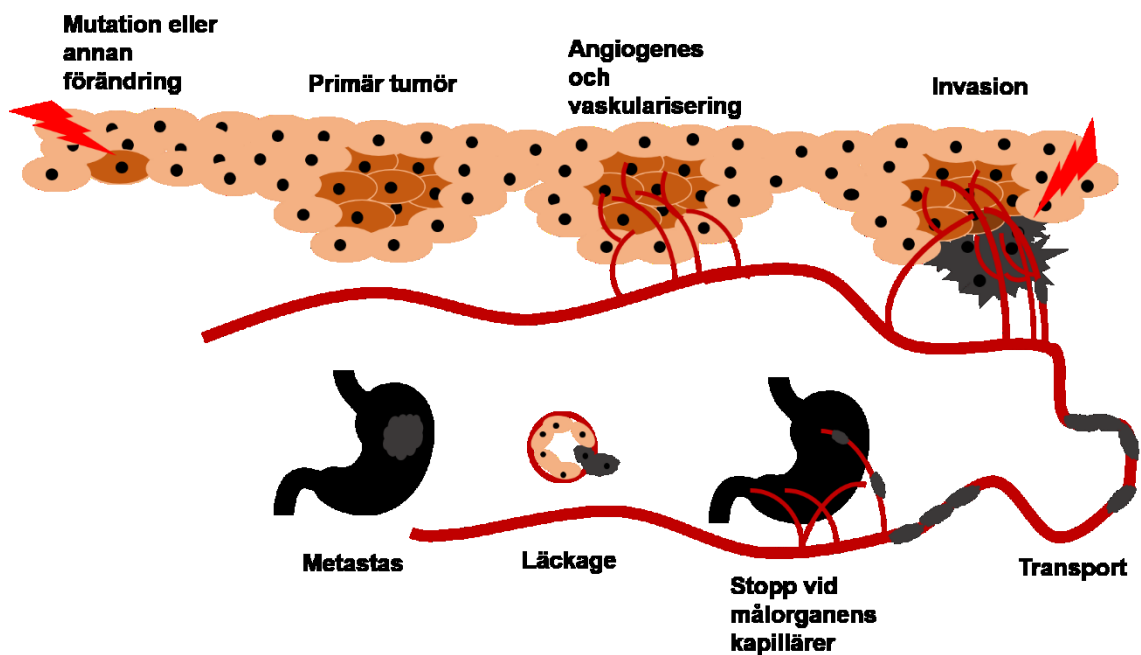
2.1 Cancer

2.1.1 Cancers uppkomst

Cancer uppstår när molekylära händelser förändrar fundamentalt cellernas sedvanliga egenskaper. Bl.a. förändringar i följande egenskaper är typiska för cancerceller: självförsörjning av tillväxtfaktorer, resistens mot anti-tillväxtfaktorer, resistens mot apoptos, aktivering av angiogenes, förändringar i metaboliska egenskaper och genomgång av invasion och metastas (Hanahan & Weinberg, 2011). Dessa förändringar leder till att cellerna delar sig okontrollerat. Orsaken till förändringarna kan exempelvis vara både genetiska och epigenetiska. Den genetiska grunden är mutationer i tumörsuppressorer och/eller onkogener som ger upphov till ett abnormt genuttryck. De epigenetiska orsakerna är ofta komplicerade och beskrivs i stora drag i avsnitt 2.3. De genetiska och epigenetiska mekanismerna går hand i hand; epigenetiska förändringar kan leda till mutationer genom att oändamålsenligt aktivera eller hämma olika signaleringsräckor, medan mutationer i epigenetiska reglerare resulterar i ett förändrat epigenom (You & Jones, 2012).

Invasion och metastas är de processer som gör cancer till en förödande sjukdom (fig. 1). I processerna ingår cancercellers migration antingen individuellt eller kollektivt från den primära tumören till antingen det lymfatiske systemet eller blodflödet och där via till andra delar av kroppen (Fidler, 1978; Friedl & Wolf, 2003). För epiteliäla cancertyper är kollektiv migration vanligast men ifall dessa cancerceller förlorar sin cell-cellvidhäftning kan de undergå epiteliä-mesenchymalövergång (eng. epithelial-mesenchymal transition, EMT) och migrera individuellt (Friedl & Wolf, 2003). EMT är en viktig process under utvecklingen men även under sårhäkning och inflammation hos vuxna individer (Scheel, Onder, Karnoub, & Weinberg, 2007; Voulgari & Pintzas, 2009). Cancerceller kan återförvärva egenskaper som möjliggör EMT via mutationer och epigenetiska förändringar och genomgå processen när de nås av signalmolekyler från den lokala omgivningen (Scheel et al., 2007). Under EMT förlorar cellerna epiteliäcellers markörer, t.ex. cell-cellvidhäftningsproteinet E-kadherin, och uppreglerar istället mesenchymala markörer, såsom N-kadherin, transkriptionsfaktorn

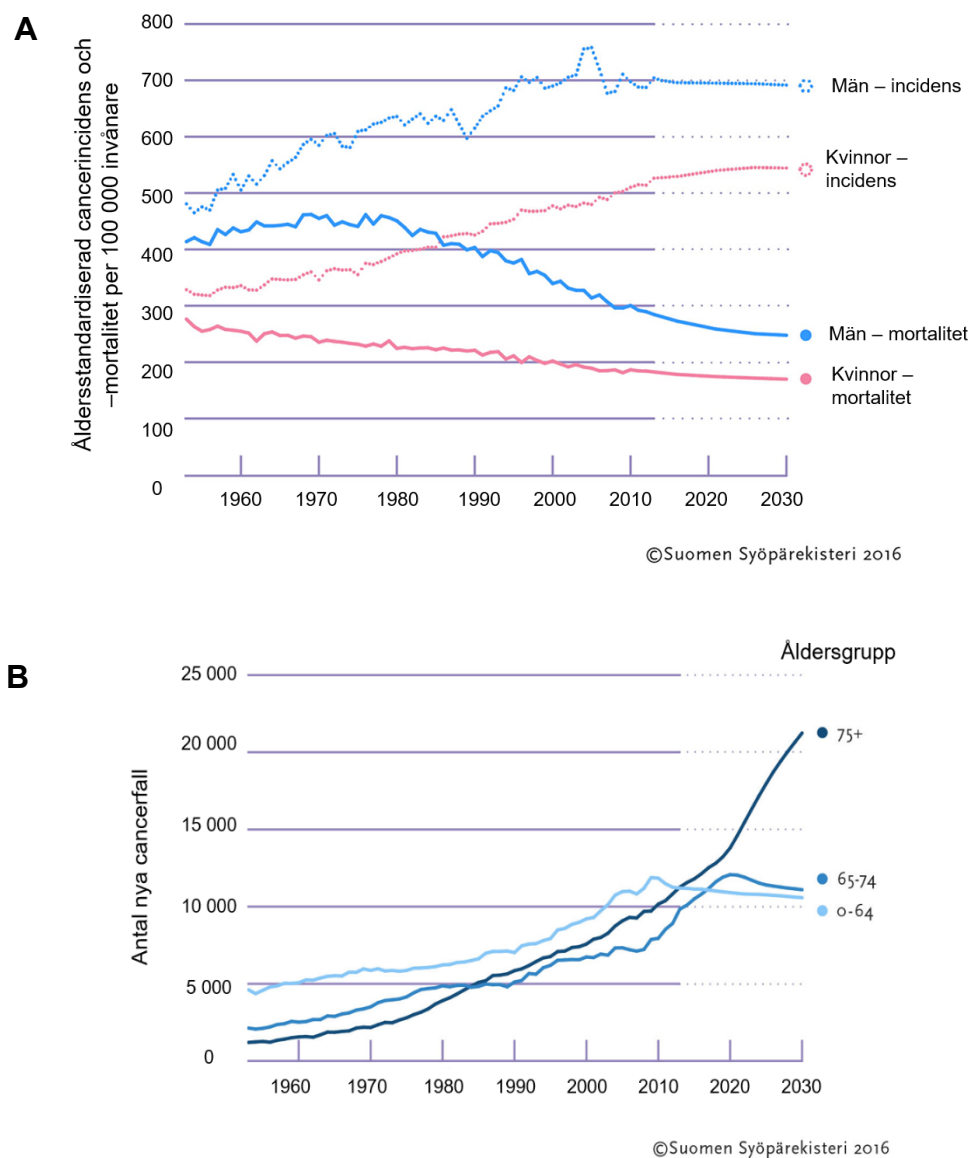
Twist-relaterad protein (TWIST) och fibronektin (Lengyel, 2010; Voulgari & Pintzas, 2009). Hursomhelst uppvisar cancerceller ofta både epitel- och mesenkymalcellers markörer (Scheel et al., 2007). EMT-processen har även beskrivits i epitelial äggstockscancer, där cellerna efter metastasbildning, oftast i bukhålan, genomgår mesenkymal–epitelialövergång till en epitelialfenotyp. I och med denna transformation kan cellerna reagera på lokala tillväxtfaktorer och därvid fortsätta att växa vid det nya målorganet (Lengyel, 2010). Därför är det ofta metastaserna som är obotliga och letala.



Figur 1. Cancerns uppkomst från felreglerad celledelning till metastas.

2.1.2 Cancerns epidemiologi

Cancerincidensen hos kvinnor har ökat signifikant från 1950-talet till 2010-talet i Finland (fig. 2) (Seppä, u.å.). Däremot har mortaliteten sjunkit. Ökningen i incidens har beräknats avta fram till år 2030 och mortaliteten torde sjunka till viss del (Seppä, u.å.). I och med den åldrande befolkningen beräknas däremot antalet nya cancerfall per år öka drastiskt hos personer som överskrider åldern 75 år inom det närmaste årtiondet (Seppä, u.å.). Utvecklingen för personer under 75 år ser mer lovande ut med ett aningen sjunkande antal nya cancerfall (Seppä, u.å.).

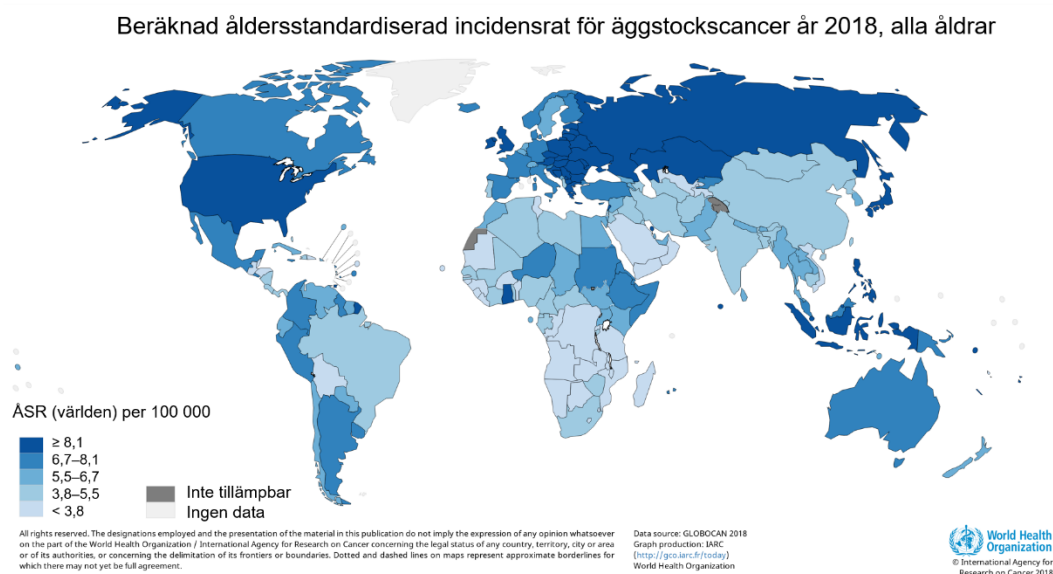


Figur 2. (A) Åldersstandardiserad cancerincidens och mortalitet per 100 000 invånare samt (B) antal nya cancerfall per åldersgrupp åren 1953–2013 med beräknad utveckling fram till år 2030. Figurerna är modifierade från Suomen Syöpärekisteri.

2.1.3 Äggstockscancers epidemiologi

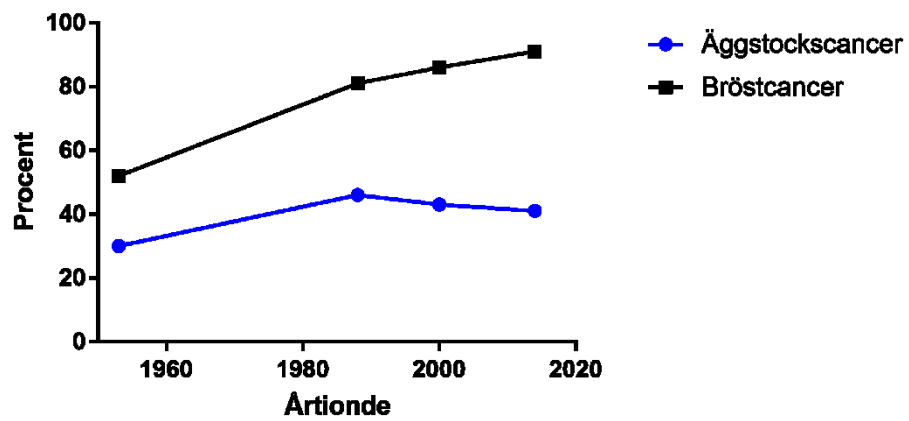
Cancer är globalt den andra ledande orsaken till mortalitet hos kvinnor, varav äggstockscancer är den sjunde mest diagnosticerade cancerformen (Torre et al., 2017; Reid et al., 2017). Årligen diagnosticeras globalt 239 000 nya fall och mortaliteten ligger på 152 000 personer, med den högsta incidensen i västra och centrala Europa där antalet patienter är ca 11 per 100 000 invånare och antalet dödsfall är 6 per 100

000 invånare (fig. 3) (Reid et al., 2017). I Finland var incidensen dryga 7 per 100 000 invånare år 2014 (fig. 3) (Suomen Syöpärekisteri, 2019; Världshälsoorganisationen, 2018). Den åldersstandardiserade relativa 5-års överlevanden för äggstockscancer som diagnostiserats i Europa under åren 2000–2007 låg på ca 40 % i medeltal; Finland visade enskilt samma överlevnadsgrad (fig. 4A) (De Angelis et al., 2014). Överlevnadsgraden har inte ökat efter dessa tio år: Suomen Syöpärekisteri rapporterade fram till år 2016 en överlevnadsgrad på dryga 40 % i Finland (fig. 4A & B). Jämfört med bröstcancer, som är den överlägset mest diagnosticerade cancer hos kvinnor i Finland, är äggstockscancers överlevnadsgrad mycket låg (fig. 3A) (Suomen Syöpärekisteri, 2019).

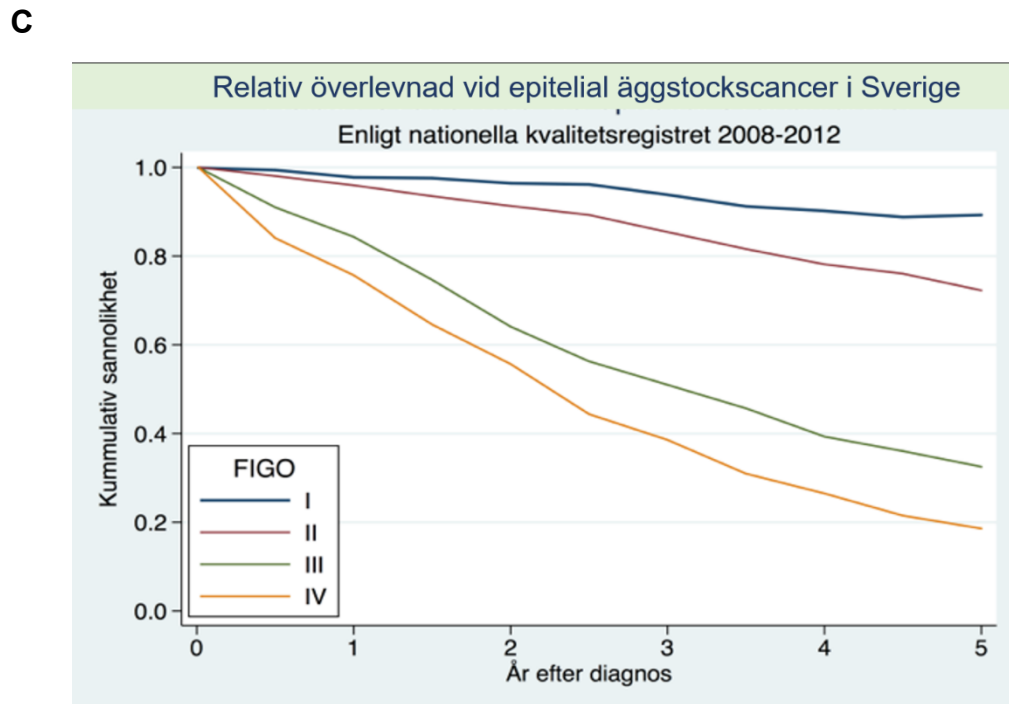
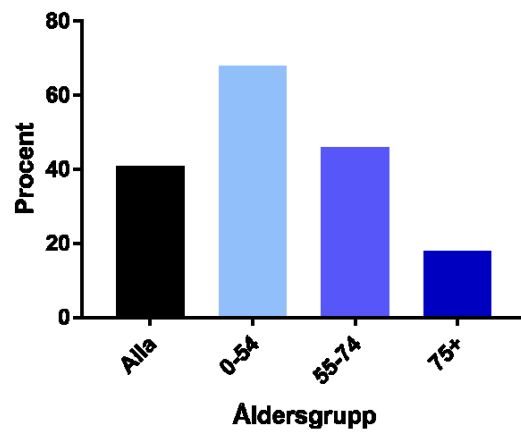


Figur 3. Åldersstandardiserad äggstockscancerincidens per 100 000 invånare inom världen år 2018. Figurerna är modifierade från Världshälsoorganisationens (eng. WHO) internationella cancerforskningsinstitut (eng. IARC). Incidensen i Finland var ca 7 per 100 000 invånare år 2018.

A 5-års relativ canceröverlevnad i Finland



B 5-års relativ överlevnad vid äggstockscancer i Finland



Figur 4. (A) 5-års relativ äggstockscanceröverlevnad jämfört med bröstcanceröverlevnad i Finland åren 1953–2016. Mätpunkterna är tagna från Brenner, Söderman, & Hakulinen, 2002; De Angelis et al., 2014 och Suomen Syöpärekisteri 2016. (B) 5-års relativ överlevnad vid äggstockscancer under uppföljningsåren 2014–2016. Datat är taget från Suomen Syöpärekisteri 2016. (C) Relativ epitelial äggstockscanceröverlevnad i Sverige per FIGO-stadie under åren 2008–2012.

Epitelial äggstockscancer (eng. epithelial ovarian cancer, EOC) är den vanligaste tumörtyper och klassificeras i åtminstone fem histologiska typer: höggradig serös (HGSOC; 70 %), endometriod (ENOC; 10 %), klarcellig (OCCC; 10 %), mucinös (MOC; 3 %) och låggradig serös (LGSOC <5 %) (Reid et al., 2017). Incidensen för OCCC är globalt mindre än 5 % av alla äggstocksmaligniteter och 3–12 % av EOC (Pectasides, Pectasides, Psyrri, & Economopoulos, 2006a). Däremot är OCCC-incidensen i Japan exceptionellt hög; upp till 25 % av EOC är OCCC (Glasspool & McNeish, 2013). Chan et al. (2008) analyserade data på EOC från nästan 30 000 fall från åren 1988 till 2001. De fann att ca 50 % av patienterna hade EOC av serös tumörtyper (sEOC) medan 5 % hade OCCC. OCCC var betydligt vanligare hos yngre patienter än sEOC med medianåldern 55 år respektive 64 år vid diagnosticering. Även de tidiga FIGO-stadierna I-II (eng. International Federation of Gynecology and Obstetrics stages) var vanligare hos OCCC; trots detta visar OCCC en sämre prognos per stadie än sEOC (Chan et al., 2008). FIGO-stadierna är klassificerade enligt följande: stadie I tumörtillväxt endast i äggstockarna, stadie II tumörtillväxt vid bäckenet, stadie III metastas i bukhålan utanför bäckenet och stadie IV avlägsen metastas (Pecorelli, Benedet, Creasman, & Shepherd, 1999).

Eftersom OCCC-incidensen är relativt låg bland EOC, behandlas den likadant som andra typer av EOC (Pectasides et al., 2006a), nämligen med kirurgi och platinumbaserad kemoterapi. OCCC är betydligt mindre känsligt för platinumbaserad kemoterapi än sEOC med en känslighetsgrad på 45 % respektive 80 % vid de sena FIGO-stadierna III-IV (Pectasides et al., 2006b). Till en början är den konventionella behandlingen ändå effektiv men de flesta patienter insjuknar på nytt (Banerjee & Kaye, 2013; Zhang et al., 2016). Återinsjuknande förekommer oftare i OCCC än i andra typer av EOC (Pectasides et al., 2006a) och när återinsjuknande sker, är äggstockscancern obotlig. På grund av detta finns det ett brådskande behov av nya behandlingsformer (Banerjee & Kaye, 2013; Zhang et al., 2016). Figur 3B och C visar potentialen för en

betydligt bättre överlevnad med tanke på den unga åldern och det tidiga skedet vid diagnos för OCCC, ifall en effektiv behandlingsform för denna typ av cancer hittades.

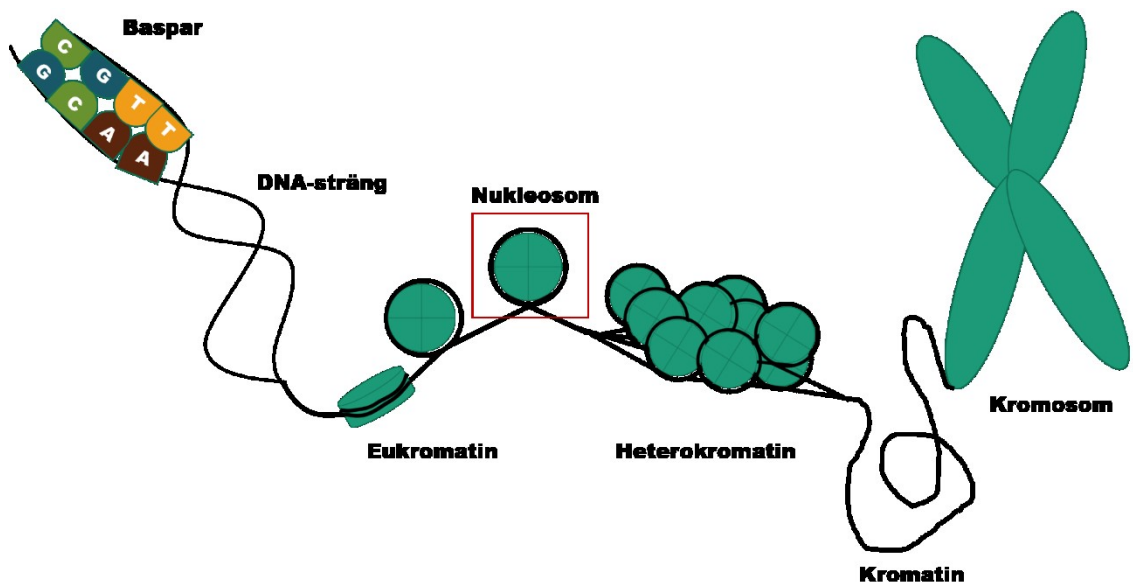
2.2 Dynamisk organisering av DNA i kromosomer

2.2.1 DNA- och kromosomstruktur

Redan i början av 1950-talet bestämde Watson och Crick (1953) deoxyribonukleinsyrans (DNA) struktur. De redovisade för en DNA-struktur som består av två ihopflätade alfa-helix-kedjor med basparen adenin–tymin (A–T) och guanin–cytosin (G–C). Strukturen hålls ihop av fosfatgrupper mellan baserna i respektive alfa-helix-kedja medan kedjorna hålls ihop med hjälp av vätebindningar mellan baserna, som utgör basparen (Watson & Crick, 1953). Eftersom mängden DNA i varje cell är enorm och alla gener inte uttrycks i varje celltyp, packar den eukaryota cellen in DNA i kromosomer för att underlätta cellulära funktioner, såsom gentranskription (Ris & Kubai, 1970). Kromosomerna byggs upp av kromatin (Ris & Kubai, 1970), vars exakta struktur inte ännu är klarlagd trots omfattande studier (Grigoryev & Woodcock, 2012). Grigoryev och Woodcock (2012) sammanfattar ändå några enhälliga resultat om kromatinets organisering: den utgörs av nukleosomer och länkande DNA, dvs. dubbelsträngat DNA mellan nukleosomerna, i ett sicksackmönster. Hur dessa sedan bildar en kompakt kromatinstruktur är tillsvidare okänt. Själva nukleosomen är väl karakteriserad och består av en histonoktamer med DNA tvinnat runtomkring (Kornberg, 1974; Li, 1975). Histonoktameren består av två enheter av följande histoner: H2A, H2B, H3 och H4 (Kornberg, 1974; Li, 1975). DNA tvinnas runt oktameren med ett mellanrum med ca 200 baspar och dessa utgör en repetitiv struktur, som sedan bildar kromatinet och kromosomen när det packas tätt ihop (Kornberg, 1974; Li, 1975). Oktamerens placering vid DNA är sekvensspecifikt; Trifonov (2010) föreslår följande repetitiva DNA-sekvens som bas för nukleosomens placering: (GGAAATTTCC)_n (Mengeritsky & Trifonov, 1983; Trifonov, 2010). Förutom histonerna i histonoktameren, finns histonen H1 konstitutivt i kromatinstrukturen där den binder både till nukleosomen och det länkande DNA:t, stabiliserar strukturen och bidrar till att bilda sicksackkromatinstrukturen (Li, 1975; Thoma, Koller, & Klug, 1979). Dessutom finns histonvarianter av H2A, H2B, H3 och H1. Några exempel är H2A.Z, H2A.X, H2ABbd och H3.3, som kan ersätta de vanliga

histonerna och förändra kromatinstrukturen (Kamakaka & Biggins, 2005). Detta kan sedan påverka cellulära funktioner, exempelvis transkription och DNA-reparation (Kamakaka & Biggins, 2005).

Två huvudtyper av kromatin förekommer, nämligen heterokromatin och eukromatin. Heterokromatin klassificeras vidare i konstitutivt och fakultativt heterokromatin. Konstitutivt heterokromatin associeras med en kompakt, permanent inaktiv form av kromatin, medan den fakultativa heterokromatinformen är mer dynamisk (Richards & Elgin, 2002). Heterokromatin innehåller oftast repetitiva DNA-sekvenser och transposoner, dvs. DNA-sekvenser som kan ändra sin position i genomet. Eukromatin innehåller däremot de flesta gener och har en mer öppen struktur än heterokromatin. Eukromatin antar den fakultativa heterokromatinformen när dess gensekvenser tystas ner. Dessa former bibehålls genom cellgenerationer: den fakultativa heterokromatinformen replikeras under mitos medan den konstitutiva formen replikeras även under meios (Richards & Elgin, 2002), vilket leder till att en eventuell avkomma ärver den konstitutiva formen av kromatin i könsceller. Utöver de nämnda typerna finns även andra intermediära former som inte diskuteras här.



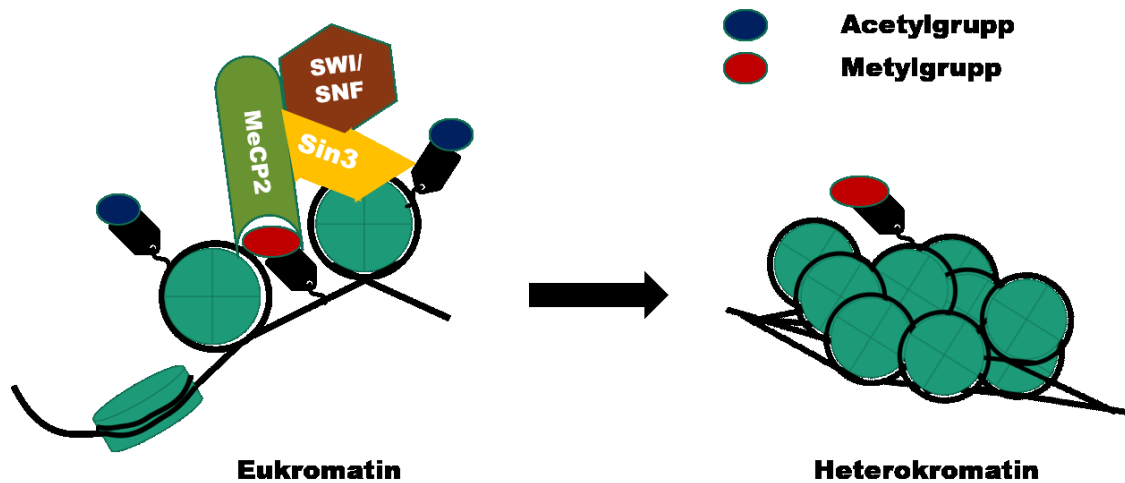
Figur 5. Kromosomens uppbyggnad.

2.3 Reglering av kromatin

Modifieringar av DNA och histoner, histonvarianter, associeringen av icke-histonprotein med kromatinet och ATP-beroende nukleosomremodelleringskomplex (eng. ATP-dependent nucleosome remodelling complex) bidrar till förändringar i kromatinstrukturen, t.ex. kromatinkondensering som leder till nedtystning av eukromatin (Li & Reinberg, 2011; Richards & Elgin, 2002; Wang, Allis, & Chi, 2007b). Såsom med andra cellulära processer påverkar många mekanismer varandra; jag kommer att knyta ihop de ovannämnda mekanismerna i följande avsnitt.

2.3.1 DNA-metylering

En välkänd modifiering av DNA är metylering av CpG-öar, dvs. DNA-sekvenser som är rika på cytosin–guaninbaspar (Razin & Cedar, 1991). Metylering av CpG-öar associeras med avstängd transkription; t.ex. hushållsgener, dvs. gener som uttrycks i alla celltyper och ofta konstitutivt, har CpG-öar som uppvisar en låg grad av metylgrupper när de är aktiva i celler (Stein, Sciaky-Gallili, Razin, & Cedar, 1983). Davey, Pennings och Allan (1997) visar att metylering av CpG-öar kan inverka på nukleosomernas placering i kromatinet och på så vis påverka cellulära funktioner. DNA-metylering kan inverka på en förändrad proteinsammansättning vid de metylerade gensekvenserna även genom associering av metylbindande proteiner, såsom metyl-CpG-bindande protein 2 (MeCP2) (Davey, Pennings, & Allan, 1997; Lewis et al., 1992). Jones et al. (1998) visar att MeCP2 attraherar histondeacetylaskomplexet Sin3, som avlägsnar acetylgrupper från histoner. Dessutom har MeCP2 visats binda i samma SWItch/Sukros-icke-fermenterbar-komplex (eng. SWItch/Sucrose Non-Fermentable, SWI/SNF) med ATPaset Brahma (Brm) (Harikrishnan et al., 2005). Utöver MeCP2-proteinets associering med SWI/SNF-komplex, har även Sin3 visats associera med dessa komplex (Sif, Saurin, Imbalzano, & Kingston, 2001). Dessa resultat tyder på att SWI/SNF-komplex och histondeacetylering spelar en roll i avstängningen av gener (fig. 6). I följande avsnitt behandlar jag mer ingående SWI/SNF-komplex och histonacetylering med fokus på aktivering av transkription. (Davey et al., 1997; Harikrishnan et al., 2005; Lewis et al., 1992; Razin & Cedar, 1991; Sif et al., 2001; Stein et al., 1983).



Figur 6. Nedtystning av eukromatin. MeCP2 känner igen DNA-metylering och rekryterar Sin3 och SWI/SNF. Sin3 avlägsnar acetylgrupper från histoner och SWI/SNF organiserar kromatinet till heterokromatin.

2.3.2 Histonmodifieringar

För tillfället känner man till åtta histonmodifieringar: acetylering, metylering, fosforylering, ubikvitinering, ribosylering, sumoylering, deiminering och isomerisering, varav de tre först nämnda är bäst karakteriserade (Kouzarides, 2007). Histonmodifieringars funktion tar sig i uttryck genom att påverka kromatinstrukturen eller genom att attrahera icke-histonproteiner. Inverkan på kromatinstrukturen orsakas i detta fall av en förändring i antingen en histon–histoninteraktion mellan olika nukleosomer eller i en DNA–nukleosominteraktion (Kouzarides, 2007).

2.3.3 Histonacetyleringens inverkan på cellulära funktioner

Histonacetylering utförs av histonacetyltransferas (HAT) och avlägsnas av histondeacetylaser (HDAC) (Kouzarides, 2007; Wang, Allis, & Chi, 2007a). Acetyleringen förekommer på lysinrester mestadels i histoners N-terminala ändar. Modifieringen associeras med aktiv gentranskription på grund av att den neutraliserar det basiska lysinets positiva laddning, som annars interagerar med det negativt laddade DNA:t. Således bidrar neutraliseringen till en öppnare kromatinstruktur (Hongit, Schroth, Matthews, Yaut, & Bradbury, 1993; Kouzarides, 2007; Wang et al., 2007a).

Även DNA-replikation, DNA-reparering och kromatinkondensering associeras med histonacetylering (Kouzarides, 2007; Wang et al., 2007a).

Acetylerade lysinrester i histoner känns igen av proteiner som har en eller flera bromodomäner i sin struktur. Till exempel binder vissa transkriptionskoaktivatorer till acetylerade histoner, vilka bidrar till en lyckad transkription (Jacobson, Ladurner, King, & Tjian, 2000). Även proteiner som tillhör bromodomän- och extraterminalproteinfamiljen (eng. Bromodomain and extra-terminal, BET), som tros fungera som transkriptionsfaktorer, och nukleosomremodelleringskomplex binder till denna histonmodifiering (Florence & Faller, 2001; LeRoy et al., 2008; Martens & Winston, 2003). En ingående översikt över det ATP-beroende nukleosomremodelleringskomplexet SWI/SNF, BET-proteinerna och BET-hämmarna ges längre fram i avhandlingen (avsnitt 2.5, 2.6 & 2.7).

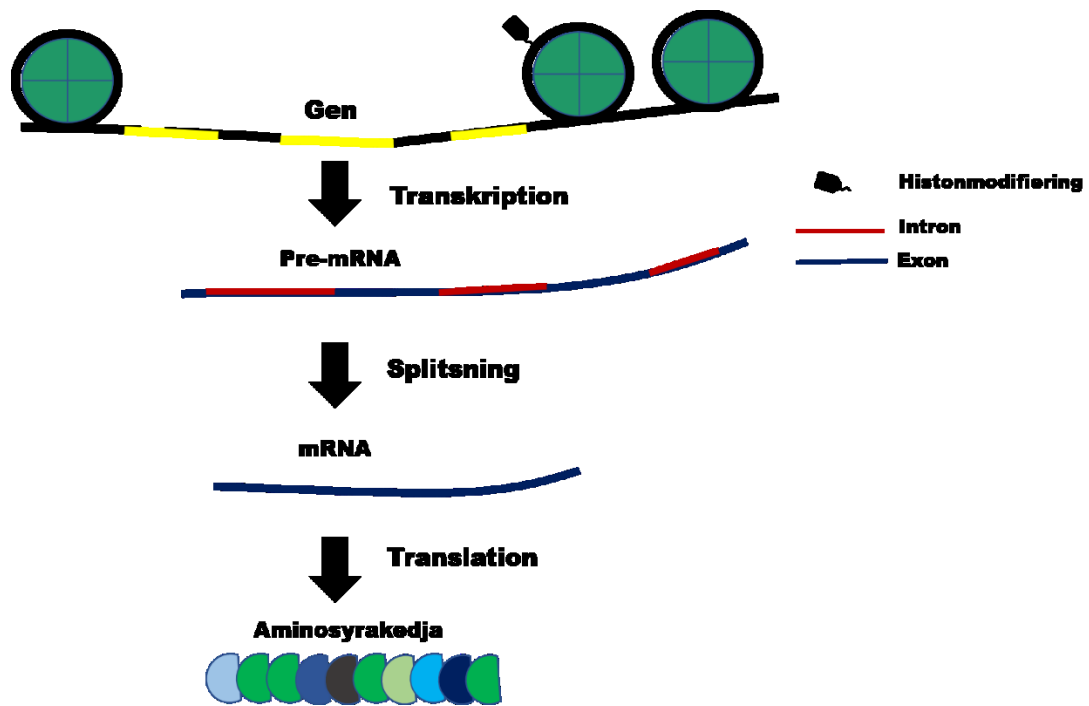
2.3.4 ATP-beroende nukleosomremodelleringskomplex

ATP-beroende nukleosomremodelleringskomplex verkar på DNA–histoninteraktioner i en nukleosom. Med energi från hydrolys av adenosintrifosfat (ATP) förändrar de nukleosomen genom att ¹ låta en oförändrad histonoktamer glida längs med DNA till en annan position, ² avlägsna en histonoktamer från DNA eller ³ ersätta en vanlig histon med en histonvariant (Hargreaves, 2011; Wang et al., 2007b). Fyra familjer av nukleosomremodelleringskomplex har karaktäriserats: SWI/SNF, imiterande SWI (ISWI), kromodomän–helikas–DNA-bindande (CHD) och inositolkrävande 80 (INO80) (Hargreaves, 2011; Wang et al., 2007b). I avsnitt 2.5 går jag ingående in på SWI/SNF-komplexet, vars subenhet adenin–tymin-rikt interaktivt domäninnehållande protein 1A (ARID1A, också kallad BRG1-associerad faktor 250a, BAF250a) är ofta muterad i OCCC (Jones et al., 2010; Wiegand et al., 2010).

2.4 Gener och proteinsyntes

2.4.1 Gener hos eukaryoter och cellens hantering av dem

Den allmänna definitionen för en gen presenterades på 1960-talet och lyder såhär: En gen kodar för ett mRNA och därvid ett protein (Gros et al., 1961; Jacob & Monod, 1961). Portin och Wilkins (2017) föreslog en ny definition på grund av komplexiteten för identifiering av en gen hos eukaryoter, definitionen är fritt översatt och förkortad: En gen är en DNA-sekvens, vars segment inte behöver vara i fysisk kontakt, och som kodar ett eller flera RNA-molekyler eller proteiner med liknande RNA- eller aminosyrasekvens. En gen består därvid av gensekvenser som kallas för exoner: mellan dessa exoner kan introner förekomma som efter transkription skärs bort från prekursor-meddelande-RNA (eng. precursor messenger RNA, pre-mRNA) och bildar meddelande-RNA (mRNA) via en process som kallas för splitsning (fig. 7) (Portin & Wilkins, 2017; Rotwein, Pollock, Didier, & Krivi, 1986). Splitsningen kan vara konstitutiv, vilket betyder att samma produkt alltid produceras från genen, eller alternativ (Portin & Wilkins, 2017). I alternativ splitsning kan vissa exoner skäras bort från pre-mRNA tillsammans med introner; genom att variera vilka exoner som lämnar som en del av det kodande mRNA:t kan cellen bilda olika vävnadsspecifika RNA- eller proteinprodukter från en gen (Portin & Wilkins, 2017; Rotwein et al., 1986). Histonmodifieringar har även visats påverka splitsningen och därvid föreslår Luco et al. (2010) en direkt koppling mellan ett adaptorprotein som binder dessa modifieringar, en splitsningsreglerare och splitsningsmaskineriet. Kopplingen kan även vara indirekt där elongering påverkas av dessa modifieringar och splitsning äger rum under elongeringen, dvs. under processen när mRNA byggs upp (Luco et al., 2010). Ty, det har visats extensivt att splitsningen äger rum under elongeringen i de flesta fall (Moore & Proudfoot, 2009). Splitsningen kan även tas om hand efter transkription strax före mRNA transporteras ut ur cellkärnan (Moore & Proudfoot, 2009).



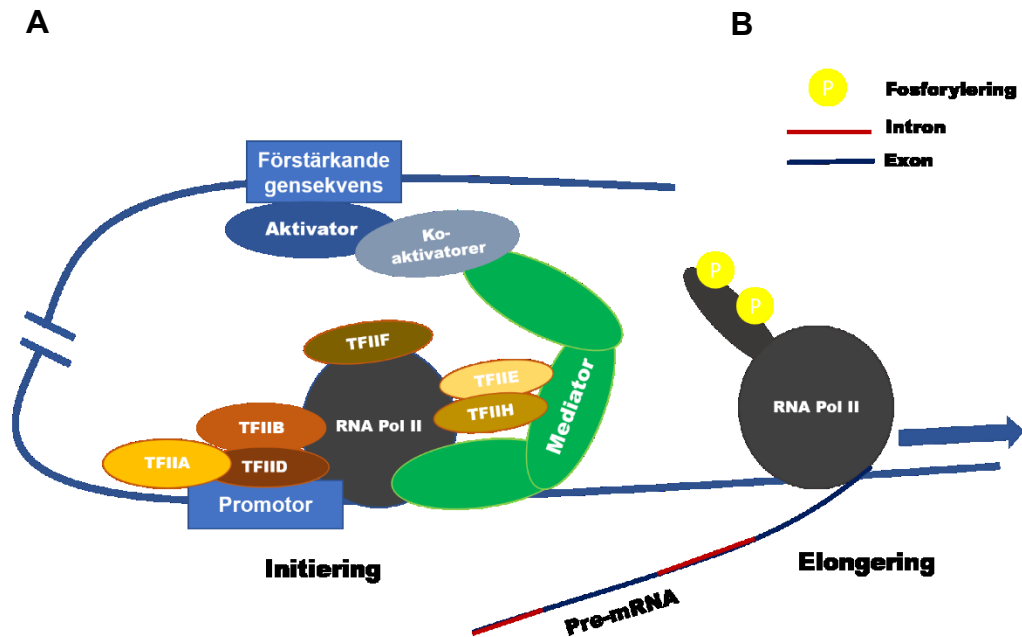
Figur 7. Proteinsyntes. En gen kodar för ett protein eller en RNA-molekyl. Efter transkription och splitsning bildas mRNA som används som mall för proteinsyntes. Under translation översätts koden från mRNA till en aminosyrakedja som genom andra processer modifieras till ett funktionellt protein.

2.4.2 Transkription – från DNA till pre-mRNA

Transkription börjar vid en gensekvens som kallas för en promotor. Denna är den minsta gensekvensen som krävs för initiering av transkription av enzymet RNA-polymeras II, som syntetiserar pre-mRNA (Krishnamurthy & Hampsey, 2009). Den första identifierade promotorn var en A–T-rik promotor som kallas för TATA-box (Krishnamurthy & Hampsey, 2009; Lifton, Goldberg, Karp, & Hogness, 1978). RNA-polymeras II klarar inte av att känna igen promotorn på egen hand och behöver därför transkriptionsfaktorer (TF) för initiering av transkription (Krishnamurthy & Hampsey, 2009). Allmänna transkriptionsfaktorer (eng. general transcription factor, GTF), som tillsammans rekryterar RNA polymeras II och bildar ett pre-initieringskomplex (PIC), har identifierats hos olika organismer *in vitro* (Orphanides, Lagrange, & Reinberg, 1996). Till dessa GTF hör TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF och TFIH (Cosma, 2002; Krishnamurthy & Hampsey, 2009; Orphanides et al., 1996). TFIID innehåller en subenhet som kallas för TATA-bindningsprotein (TBP), som binder till promotorn och inducerar en kromosomal ögla (eng. chromatin looping) (Krishnamurthy & Hampsey, 2009). TFIIB binder sedan till DNA–TBP-komplexet

och rekryterar komplexet RNA polymeras II/TFIIF. TFIIE och TFIIH binder därefter till RNA polymeras II-komplexet och fullbordar PIC (Cosma, 2002; Krishnamurthy & Hampsey, 2009; Orphanides et al., 1996). TFIIE aktiverar därefter elongering av RNA polymeras II (Cosma, 2002). TFIIA kan binda till TBP och stabilisera dess interaktion med DNA (fig. 8) (Cosma, 2002). För ännu fullständigare reglering av transkription regleras GTF av aktivatorer och repressorer: aktivatorer rekryterar GTF till promotorn för snabbare sammankomst medan repressorer förhindrar GTF att binda till promotorn (Orphanides et al., 1996). Olika aktivatorer har olika funktioner: de kan binda nära promotorn eller vid förstärkande gensekvenser (eng. enhancers) och möjliggöra transkription antingen under initiering eller elongering (Ma, 2006). De kan ¹ binda till packade nukleosomer och rekrytera nukleosomremodelleringskomplex eller histonacetyltransferas ² binda till promotorn efter nukleosomremodellering och histonacetylering eller ³ rekrytera GTF. Gener hos eukaryoter är ofta beroende av aktivatorers funktion för transkriptionsaktivering (Ma, 2006). Aktivatorer och repressorer associerar oftast inte med GTF direkt utan kräver ett annat proteinkomplex, Mediator, som fungerar som en länk mellan olika komponenter under transkriptionsinitieringen (fig. 8). Mediator krävs för transkription från de flesta promotorer (Krishnamurthy & Hampsey, 2009).

När PIC är fullständig kan elongering påbörjas. TFIIH fosforylerar RNA polymeras II vid den C-terminala domänen (CTD), varefter RNA polymeras kan aktiveras. Hursomhelst regleras elongeringen också av elongeringsfaktorer. Ett gott exempel är det positiva transkriptionselongeringsfaktor b-komplexet (P-TEFb), som också fosforylerar RNA polymeras II vid CTD men även vid den C-terminala regionen (CTR), vilket leder till att polymeraset aktiveras (Yamada et al., 2006).



Figur 8. Transkriptionsinitiering och -elongering. (A) Initiering. TFIID binder till promotorn varefter TFIIB binder och rekryterar RNA polymeras II–TFIIF till komplexet. TFIIA stabiliserar bindningen till promotorn. TFIIE och TFIIH binder till RNA polymeras II och fosforylerar detta, varefter RNA-polymeras aktiveras för elongering. Bättre reglering möjliggörs av koaktivatorer och aktivatorer (eller korepressorer och repressorer) som binder via Mediator till komplexet och förstärkande gensekvenser. Dessutom krävs ofta även elongeringsfaktorer (inte visade) för aktiveringen. (B) Elongering. Fosforylerad RNA polymeras II syntetiserar pre-mRNA.

Efter transkription och splitsning äger proteinsyntesen rum via en process som kallas för translation (fig. 7). Under translation översätts nukleotidkoden från mRNA till en lång aminosyrakedja vid stora proteinkomplex, sk. ribosomer (Iborra, Jackson, & Cook, 2001). En transfer-RNA-molekyl (tRNA) binder en aminosyra vid ena ändan och parar ihop den med mRNA via komplementär basparning (Chapeville et al., 1962). Genom flera sådana reaktioner bildas ett protein i en primär struktur som senare veckas ihop och modifieras till ett funktionellt protein (Vitale, Ceriotti, & Denecke, 1993).

2.5 SWI/SNF-komplex

De flesta SWI/SNF-komplex som förekommer hos människan innehåller åtta eller nio subenheter och komplexens komposition kan variera mellan celltyper (Kingston & Narlikar, 1999). De olika subenheterna (Wu, Jiang I., Lessard, & Crabtree, 2009) är listade i tabell 1. Brahma-relaterad gen (BRG) och Brahma (BRM) är ATPaser i

komplexen och de förekommer inte i samma komplex (Wu et al., 2009). Dessutom har det föreslagits att det finns huvudsubenheter som finns i alla SWI/SNF-komplex, såsom INI-1, BAF170 och BAF155 (Wang, Haswell, & Roberts, 2014). SWI/SNF-komplex påverkar sina målgener oftast genom att stänga av (repressera) dem (Wu et al., 2009). Dock har SWI/SNF-komplex även upptäckts reglera alternativ splitsning under transkriptionselongering via BRM:s association med RNA polymeras II (Batsché, Yaniv, & Muchardt, 2006). Åtminstone en histonmodifiering som rekryterar SWI/SNF-komplex via bromodomänen hos BRG1 är acetylering av lysin 8 på histon 4 (H4K8ac) (Peterson & Laniel, 2004).

Tabell 1. Subenheter som förekommer i olika SWI/SNF-komplex (Wu et al., 2009).

| Subenheter i SWI/SNF-komplex | | | |
|------------------------------|---------|--------------------------|--------------|
| BRG, BRM | BAF170 | BAF155 | BAF57 |
| BAF60a, b, c | β-aktin | BAF45 a, b, c, d | BAF53a, b |
| BAF47, SNF5, INI-1 | BAF180 | ARID1A, B /BAF250a, b | ARID2/BAF200 |

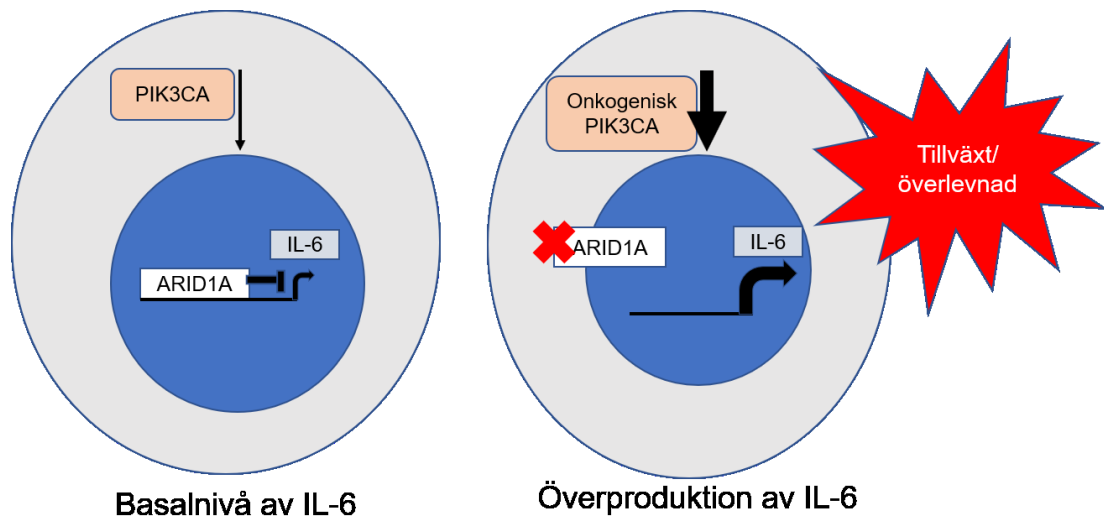
2.5.1 *ARID1A*-mutationer i OCCC

Adenin-tymin(AT)-rik interaktiv domän-innehållande protein 1A (*ARID1A*, också kallad *BRG1-associerad faktor 250a*, *BAF250a*) är muterad i mer än 50 % av OCCC-fall och 32 olika mutationer har hittats i genen i denna cancerform (Jones et al., 2010; Wiegand et al., 2010). Dessa mutationer leder till ett kortare protein antingen genom en substitution som bildar en stopp-kodon eller genom insättning eller radering av en bas som orsakar en felaktig läsram (Jones et al., 2010). Mutationerna tros orsaka ett inaktivt protein (Jones et al., 2010). Katagiri et al. (2012) visar att avsaknad av *ARID1A* kan vara en viktig prognostisk faktor för OCCC, eftersom sådana tumörer är ofta resistent mot platinumbaserad kemoterapi. Mutationer i *ARID1A* förekommer inte i sEOC, vilket kan förklara den enorma skillnaden i känsligheten för

platinumbaserad kemoterapi mellan dessa två tumörtyper (Guan et al., 2011; Pectasides et al., 2006b).

ARID1A ingår i det ATP-beroende nukleosomremodelleringskomplexet SWI/SNF och är en av de ömsesidigt uteslutande ARID1-subenheterna i komplexet (Jones et al., 2010; Wu et al., 2009). ARID1A binder till DNA utan preferens för DNA-sekvenser men den har ändå visats bidra med specificitet till komplexet (Jones et al., 2010; Nagl, Wang, Patsialou, Van Scoy, & Moran, 2007; Wilsker et al., 2004). En förklaring till detta kan vara att SWI/SNF-komplex rekryteras till rätt plats i rätt tid tack vare sekvensspecifika transkriptionsfaktorer och komplexets subenheters interaktioner med kromatin (Chandler et al., 2013). Funktionella studier har indikerat att ARID1A, som en komponent i SWI/SNF-komplexet, hämmar celltillväxt (Jones et al., 2010; Nagl et al., 2007). Den har därför föreslagits fungera som en tumörsuppressör (Jones et al., 2010). *ARID1A* är även muterad i flera andra cancertyper, till exempel i magcancer, bröstcancer och bukspottkörtelcancer (Mamo et al., 2012; Shain et al., 2012; Wang et al., 2011; Wu & Roberts, 2013).

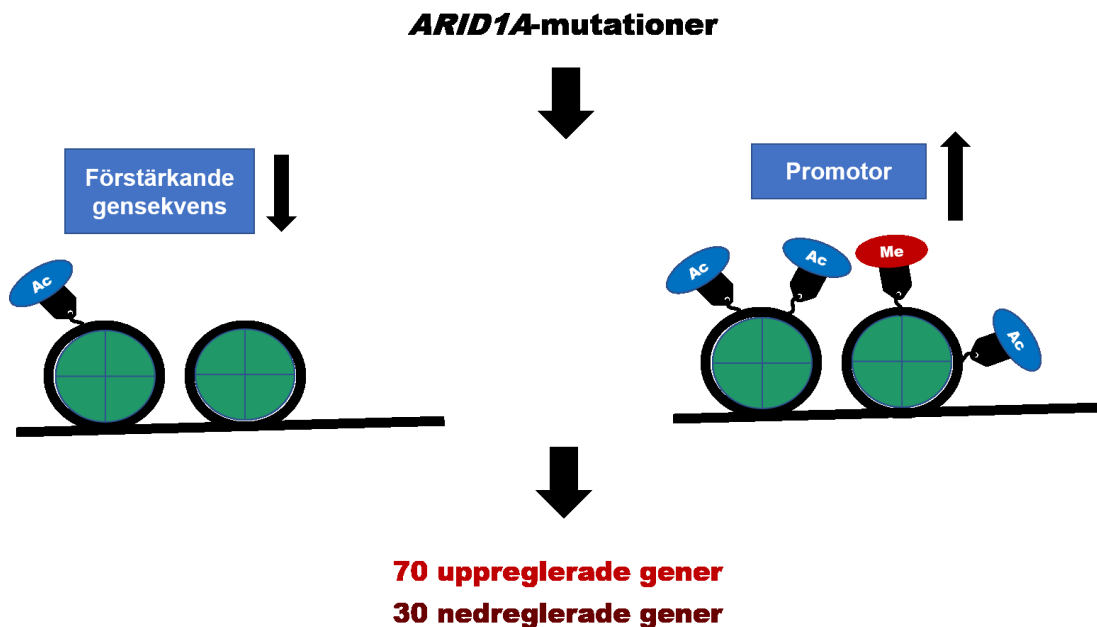
ARID1A är muterad tillsammans med *PIK3CA* (*Phosphatidylinositol-4,5-bisfosfat-3-kinas katalytisk subenhet alfa-isoform*) i så många som en tredjedel av OCCC-fall (Chandler et al., 2015). Mutationer i *PIK3CA* gör PI3-kinaset (PI3K) ständigt aktivt (Zhao & Vogt, 2008). I en musmodell som motsvarar genetiskt och histologiskt OCCC hos människor, är det dessa två mutationer som sätter igång cancerutvecklingen (Chandler et al., 2015). Chandler et al. (2015) visar att när ARID1A är närvarande i celler, binder den nära promotorn för *interleukin-6* (*IL-6*). När ARID1A-proteinnivån minskar, minskar även proteinets bindning nära promotorn. Chandler et al. (2015) föreslår en modell där ARID1A hämmar transkriptionen av *IL-6*. När *ARID1A* är muterad försvinner hämningen. *ARID1A*-mutationer leder i detta fall till att *IL-6* överuttrycks på grund av att dess promotor är nu tillgänglig för PI3K:s målproteiner (fig. 9) (Chandler et al., 2015). *IL-6* är ofta överuttryckt i cancer eftersom den hämmar apoptos, vilket leder till att cancerceller kan överleva även toxiska förhållanden, såsom kemoterapi (Hodge, Hurt, & Farrar, 2005). Det är även värt att notera att PI3K spelar en roll i aktivering av migration via signalinitiering från kemokiner och tillväxtfaktorer (Friedl & Wolf, 2003).



Figur 9. Modell för cancerutveckling i *ARID1A-PIK3CA*-muterad OCCC där IL-6 överuttrycks.

OCCC är förknippat med endometrios och *ARID1A*-mutationer kan vara den drivande kraften för utvecklingen till OCCC (Lakshminarasimhan et al., 2017; Lim et al., 2009). Nästan 40 % av koreanska patienter med OCCC visade på endometrios (N=43) (Lim et al., 2009). Lakshminarasimhan et al. (2017) undersökte en immortaliserad endometrial cellinje, som de nedreglerade uttrycket av *ARID1A* på. Upptäckterna gav intressanta indikationer på *ARID1A*:s funktion. Nedreglering av *ARID1A* ökar betydligt acetyleringen och i vissa fall metyleringen av histon 3 på lysin 27 (H3K27ac och H3K27me3); förändringarna upptäcktes ofta vid promotorer (Lakshminarasimhan et al., 2017). Detta är speciellt intressant med tanke på att *ARID1A*-DNA-interaktioner är nödvändiga för SWI/SNF-komplexets bindning till promotorer och SWI/SNF-komplex har visats associera med Sin3-histondeacetylaskomplex (Chandler et al., 2013; Sif et al., 2001). I deras undersökning hittade Lakshminarasimhan et al. även en minskning i H3K27ac men i detta fall vid förstärkande gensekvenser (fig. 10). Denna observation förstärks av upptäckten att *ARID1A*-mutationer försämrar reglering av genuttryck vid förstärkande gensekvenser: både mängden histonmodifieringar och deras position vid dessa gensekvenser visades vara signifikant olik mellan *ARID1A*-muterade celler och vildtypsceller (Mathur et al., 2017). Nedreglering av *ARID1A* har visats förändra uttrycket av 100 gener, därav är knappt 30 nedreglerade (Lakshminarasimhan et al., 2017). Dessa resultat indikerar att *ARID1A* reglerar genuttryck genom att förändra histonmodifieringar, speciellt histonacetylering, och på

det sättet påverkar DNA:s tillgänglighet för transkriptionsmaskineriet (Lakshminarasimhan et al., 2017).



Figur 10. *ARID1A*-nedregleringens inverkan på genuttryck enligt undersökningen av Lakshminarasimhan et al. (2017).

Ett bra exempel på hur en förändring i histonmodifieringar främjar cancerutveckling kommer från undersökningen av Rahmanto et al. (2016) där *ARID1A* har visats fungera som en negativ transkriptionsreglerare för telomerasomvändtranskriptas (eng. telomerase reverse transcriptase, TERT). TERT är den katalytiska subenheten i telomeras, som är ett viktigt enzym för att bibehålla telomerlängden (Bodnar et al., 1998). Telomerer är repetitiva DNA-sekvenser vid kromosomers ändor, som i sedvanliga förhållanden förkortas under DNA-replikation (Harley, Futcher, & Greider, 1990). Förkortning av telomerer begränsar antalet celldelningar, därför är TERT ofta överuttryckt i cancer, där celler delar sig okontrollerat (Allsopp et al., 1995; Harley et al., 1990; Mathur, 2018). Uttryck av *ARID1A* är i detta fall förknippat med en ökning i H3K9me och rekrytering av Sin3A, som är en känd transkriptionsförhindrare (eng. transcription repressor) (Rahmanto et al., 2016). Eftersom *ARID1A* ökar H3K9me, torde *ARID1A*-muterade celler förlora åtminstone en del av denna histonmodifiering som annars förekommer i differentierade celler (Rahmanto et al., 2016; Sarkies & Sale,

2012) . Förändringen har tidigare upptäckts i HeLa-cancerceller (Wen, Wu, Shinkai, Irizarry, & Feinberg, 2009).

2.6 BET-proteinfamiljen

En klass av proteiner som känner igen och binder till acetylerade lysinrester med hjälp av bromodomäner är bromodomän- och extraterminal proteinfamiljen (eng. *Bromodomain and extra-terminal*, BET). Hit hör proteinerna bromodomänprotein 2, 3 och 4 (BRD2, BRD3 och BRD4) och den testikel-specifika BRDT. BRD2, BRD3 och BRD4 visar större affinitet för åtminstone H4 ju fler lysiner som är acetylerade (Dey et al., 2003; LeRoy et al., 2008). BET-proteinerna rekryterar vävnadsspecifika transkriptionskomplex till acetylerade histoner och kromatin och de har många olika sätt att påverka transkription (Wang & Filippakopoulos, 2015).

2.6.1 BRD2

BRD2 har oftast upptäckts vid eukromatin och har visats associera med RNA polymeras II, E2F, cyklin-beroende kinas 8 (CDK) och Mediator-proteinkomplexet vid acetylerade H3 och H4 (Crowley, Kaine, Yoshida, Nandi, & Wolgemuth, 2002). BRD2 binder exempelvis till H4K12, som är ett substrat för HAT-transkriptionskoaktivatorer och vars acetylering är förknippat med aktiv transkription (Kanno et al., 2004; Peterson & Laniel, 2004). E2F är en grupp transkriptionsfaktorer som är viktiga för genomförandet av cellcykeln (Attwooll, Denchi, & Helin, 2004). Tillsammans med E2F har BRD2 visats aktivera transkription vid *cyklin D1*-, *A*- och *E*-promotorer, vars uttryck är nödvändiga under cellcykeln (Denis, Vaziri, Guo, & Faller, 2000). Dock minskar nedreglering av BRD2 endast transkriptionen av *cyklin D1*; både BRD2 och BRD3 binder längs med hela genen, vilket tyder på att de krävs även vid transkriptionselongering (LeRoy et al., 2008). Dessutom minskar även nedreglering av BRD4 uttrycket av denna gen (Rahman et al., 2011). LeRoy et al. (2008) visar att funktionella bromodomäner hos BRD2 krävs för transkription av de gener som den reglerar, vilket betyder att dess bindning till acetylerade histoner är essentiell för dess funktion. Mediator ingår i ett preinitieringskomplex för transkription tillsammans med RNA polymeras II och flera transkriptionsfaktorer (fig. 8) (Poss,

Ebmeier, & Taatjes, 2013). Dessa upptäckter tyder på en stark koppling mellan BRD2 som reglerare av transkriptionsinitiering och -elongering.

Dessutom har BRD2 visats påverka alternativ splitsning av sådana pre-mRNA:n som kodar proteiner involverade i cellulär kommunikation, cell–substratvidhäftning, signalöverföring och reglering av lokalisering (Hnilicová et al., 2013). Proteiner som står för dessa funktioner är ofta felreglerade i cancer, ett exempel är fokalvidhäftningskinas (eng. focal adhesion kinase, FAK), vars uttryck är uppreglerat i de flesta invasiva äggstockscancercellinjer (Sood et al., 2004). FAK är viktigt för cell–substratvidhäftning men även för signalöverföring: den aktiveras av olika stimuli, t.ex. av tillväxtfaktorer (Schaller, Borgman, & Parsons, 1993; Schaller, 2001). Hnilicová et al. (2013) föreslår att den alternativa splitsningen äger rum under transkriptionsinitiering, eftersom ungefär hälften av de pre-mRNA:n som BRD2 påverkar splitsningen av är kodade av sådana gener vars uttryck BRD2 reglerar. Hnilicová et al. visar även att nedreglering av BRD2 minskar uttrycket av 1000 gener, medan det ökar uttrycket av 500 gener. Många av dessa gener är involverade i signalöverföring (Hnilicová et al., 2013). Detta tyder på att BRD2-proteinet oftast ökar uttrycket av sina målgener när den reglerar transkription.

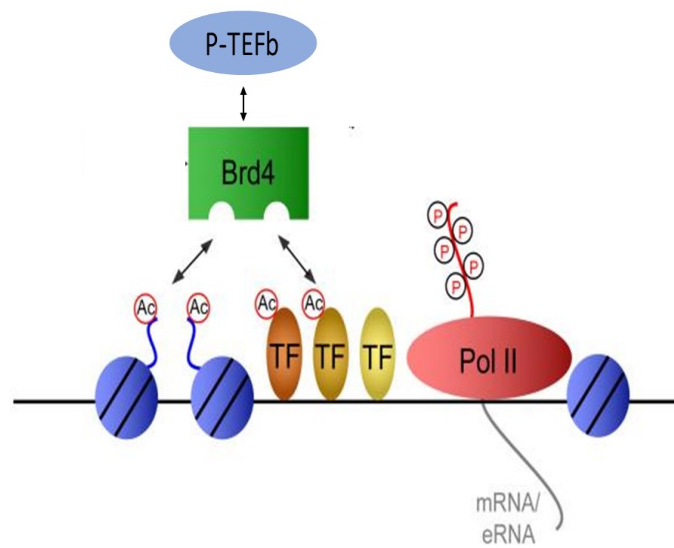
2.6.2 BRD3

BRD3 är också förknippat med eukromatin och transkription. Såsom BRD2, binder den vid *cyklin D1*. Båda proteinerna binder även vid generna *RPL7* och *RPS28*, vars proteinprodukter är subenheter i ribosomer, som är viktiga för proteinsyntes (LeRoy et al., 2008). BRD3 har även specifika gener som den binder till, exempelvis *geminin*, vilket tyder på att dessa proteiner har både distinkta och överlappande funktioner (LeRoy et al., 2008). Geminin är ett litet protein som hämmar DNA-replikation under cellcykelns S-, G2 och M-faser (McGarry & Kirschner, 1998). Dessutom binder BRD3 till transkriptionsfaktorn GATA1 när den är acetylerad. GATA1 styr BRD3 till kromatinet, BRD3 fungerar därför som en transkriptionskofaktor (Gamsjaeger et al., 2011; Lamonica et al., 2011). Dessutom rekryteras BRD3 av GATA1 till både avstängda och aktiva målgener oberoende av histonacetylering (Lamonica et al., 2011). GATA1 verkar vara en nedströmseffektor av fibroblasttillväxtfaktor 2 (FGF2), som är överuttryckt i epitelial äggstockscancer (De Cecco et al., 2004). FGF2 verkar i

sin tur reglera EMT men detta korrelerar inte med sjukdomens framskridande (De Cecco et al., 2004).

2.6.3 BRD4

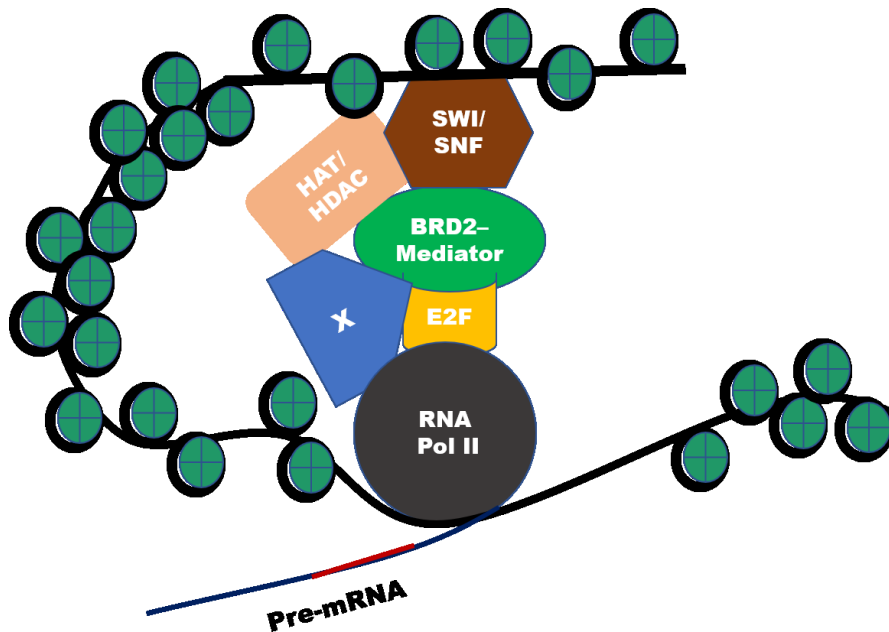
BRD4 är också en viktig reglerare av transkriptionsinitiering och -elongering (Wang & Filippakopoulos, 2015). Den rekryterar P-TEFb till kromatin (fig. 11) genom att underlätta dissociationen av den hämmande faktorn hexametylen-bisacetamid-inducerbar-1 (HEXIM1) (Wang & Filippakopoulos, 2015). Aktiv P-TEFb aktiverar sedan RNA polymeras II genom fosforylering och därmed transkription av målgenerna (Wang & Filippakopoulos, 2015). Hursomhelst har det visats att BRD4 kan till och med själv fosforylera RNA polymeras II och därmed aktivera polymeraset (Rahman et al., 2011). Dessutom rekryterar den flera proteiner till ett komplex, såsom histonmetyltransferaset NSD3 (Rahman et al., 2011). BRD4 kan även binda till vissa transkriptionsfaktorer. Ett exempel är transkriptionsfaktorn TWIST (Shi et al., 2014), som kontrollerar EMT under cancers framskridande. Interaktionen mellan BRD4 och TWIST indikerar att BRD4 spelar en roll i epitelial cancer och det kan vara den bidragande orsaken till de terapeutiska effekterna som observerats i bröstcancer-xenograftmodeller vid hämning av BET (Shi et al., 2014). Dessutom associerar BRD4 med enzymerna arginin-demetylas och lysin-hydroxylas (JMJD6) samt med glioma tumörsuppressor region gen 1-protein (GLTSCR1) via dess ET-domän (Rahman et al., 2011). Dessa proteiner interagerar även med SWI/SNF-komplexet (Middeljans et al., 2012; Miller, Mohn, & Weinmann, 2010). Det är dock oklart om associationen har en signifikant betydelse för reglerandet av kromatinstrukturen (Shi & Vakoc, 2014). Det är värt att notera att BRD2 och BRD3 också associerar med JMJD6 och GLTSCR1 (Rahman et al., 2011).



Figur 11. Aktivering av transkriptionselongering. BRD4 binder till acetylerade histoner och transkriptionsfaktorer, varefter den rekryterar P-TEFb. P-TEFb aktiverar RNA polymeras II genom fosforylering. Figur modifierad från Shi & Vakoc, 2014.

2.6.4 BET-proteiner, SWI/SNF-komplex och cancer

BET-proteinerna underlättar transkriptionsintiering och -elongering. De kan till och med avlägsna nukleosomala barriärer utan hjälp av P-TEFb eller andra elongeringsfaktorer (LeRoy et al., 2008; Wang & Filippakopoulos, 2015). LeRoy et al. (2008) föreslår att BRD2 och BRD3 fungerar som chaperoner under elongeringsprocessen. Dessutom har BRD2 visats associera med SWI/SNF-komplexets subenheter ARID1A, BAF-155 och BRG1, RNA Polymeras II, HDAC, HAT, E2F-1 och andra transkriptionsfaktorer och -koaktivatorer vid *cyklin A*-promotorn (fig. 12) (Denis et al., 2006). Komplexet var mestadels bundet till histonerna H2B och H4 (Denis et al., 2006). Detta tyder på att BET-proteiner fungerar som en adapter mellan olika komplex och transkriptionsmaskineriet; på detta sätt möjliggör de transkription. Det har även föreslagits att BET-proteinerna avläser en histonkod, dvs. ett mönster av histonmodificeringar, därvid rekryterar de dessa komplex till sig (Kanno et al., 2004; LeRoy et al., 2008; Loyola & Almouzni, 2004).



Figur 12. Transkription med BRD2 som adapter mellan olika komplex. X representerar andra viktiga komponenter under processen, t.ex. transkriptionskoaktivatorer.

Det har visats att BET-proteinerna reglerar uttrycket av både samma gener, såsom cyklin D1, och olika gener (Denis et al., 2000; LeRoy et al., 2008; Rahman et al., 2011). Det är häpnadsväckande att de dessutom reglerar uttrycket av varandra: vid nedreglering av BRD2 minskar uttrycket av BRD4 med 75 % medan uttrycket av BRD3 ökar med 40 % (Hnilicová et al., 2013). Detta bör beaktas vid hämning av något av dessa proteiner.

Det är möjligt att BET-proteiner spelar en roll i förändringen från heterokromatin till eukromatin och bibehåller eukromatinstrukturen (Schulz et al., 2002). Dessutom har det visats att BRD2 och BRD4 binder till acetylerade histoner även under mitos, vilket tyder på att dessa hjälper till att aktivera transkription på nytt efter celledelning och är därvid involverade i epigenetisk ärftlighet (Dey et al., 2003; Kanno et al., 2004). Dessa BET-funktioner tillsammans med mutationer i *ARID1A*, vars proteinprodukt förändrar speciellt histonacetylering och därvid många geners uttryck, och en direkt association av åtminstone BRD2 och SWI/SNF-komplex vid transkription är en farlig kombination som kan leda till ett förändrat epigenom och cancerutveckling (Denis et al., 2006; Lakshminarasimhan et al., 2017).

2.7 BET-hämmare för behandling av cancer

År 2010 rapporterades det om de första hämmarna för BET-proteinerna, JQ1 (Filippakopoulos et al., 2010) och iBET (Nicodeme et al., 2010). Hämmarna binder med hög affinitet till BET-bromodomäner och konkurrerar om bindningen med acetylerade peptider. Därmed tränger de undan BET-proteinerna från kromatinet (Fig. 2) (Shi & Vakoc, 2014). JQ1 binder med lika hög affinitet till BRD3 och BRD4: dissociationskonstanten för första bromodomänen är 50 nM medan den är 90 nM för den andra bromodomänen. BRD2 visar tre gånger lägre affinitet för den första bromodomänen (Filippakopoulos et al., 2010). iBET binder bromodomänerna hos BRD2, BRD3 och BRD4 med motsvarande affinitet, nämligen med en dissociationskonstant på 50–60 nM (Nicodeme et al., 2010). Det är värt att notera att det i största delen av studierna med BET-hämmare är BRD4 som medför den terapeutiska effekten (Shi & Vakoc, 2014). Till exempel orsakar undanträngning av BRD4 cellcykelstopp och initierar apoptos (Wadhwa & Nicolaidis, 2016).

Gener, vars transkription påverkas av BET-hämmaren JQ1, uppvisar ofta höga nivåer av BRD4 vid närliggande förstärkande gensekvenser (eng. enhancers). Sådana gensekvenser verkar vara den största källan för BRD4-beroende transkriptionsaktivering (Shi & Vakoc, 2014). En liten del av de förstärkande gensekvenserna har exceptionellt höga nivåer av regleringsfaktorer, däribland BRD4; dessa regioner kallas för super-förstärkande gensekvenser (eng. super-enhancers) och de styr transkriptionen av flera viktiga onkogener (Khan, Mathelier, & Zhang, 2018; Shi, Junwei & Vakoc, 2014). Super-förstärkande gensekvenser är ofta aktiva och reglerar celltypsspecifika geners transkription (Khan et al., 2018). Det verkar som om gener som styrs av super-förstärkande gensekvenser är speciellt känsliga för BET-hämning (Shi & Vakoc, 2014). Till exempel när primära multipel myelom-celler behandlades med ökande koncentrationer av JQ1 blev super-förstärkande gensekvenser mindre associerade med BRD4 jämfört med vanliga förstärkande gensekvenser (Lovén et al., 2013). Därmed tror man att BET-hämmare selektivt hämmar gentranskription vid super-förstärkande gensekvenser. En orsak till att super-förstärkande gensekvenser är känsligare för BET-hämning kan vara att det i regleringen av sådana sekvenser ingår många faktorer som samverkar i bindningen till sekvenserna och i aktiveringen av dem. Detta leder till att små förändringar i aktivator-koncentrationer kan resultera i dramatiska förändringar i transkriptionen av

deras målgener. Ett bra exempel på en onkogen som är associerad med superförstärkande gensekvenser är *c-MYC* (Lovén et al., 2013; Zhang et al., 2016). Uttrycket av *c-MYC* nedregleras vid BET-hämning, vilket verkar vara ett resultat av att bindningen av BRD4 till *c-MYC*:s förstärkande gensekvens hämmas (Delmore et al., 2011; Lovén et al., 2013). Genom att påverka uttrycket av *MYC* och andra viktiga onkogener, anses BET-hämmare vara lovande epigenetiska cancerläkemedel.

Flera studier visar på terapeutiska effekter hos BET-hämmare i musmodeller med hematologiska maligniteter (ofta *c-Myc*-beroende cancerformer), såsom lymfoblastisk leukemi, lymfom och multipel myelom (Abedin, Boddy, & Munshi, 2016; Ott et al., 2012). Även många fasta tumörer är känsliga för BET-hämning. Ett exempel är neuroblastom som ofta karaktäriseras av överuttryck av *MYCN*. Hos sådana tumörer tystar JQ1 ner *MYCN*-uttrycket (Puissant et al., 2013; Shi & Vakoc, 2014). Även i höggradig serös äggstockscancer tystar JQ1 ner *MYCN*- och *c-MYC*-uttrycket: verkan på dessa geners transkription förmedlas av hämning av BRD4 både i cellinjer och primära xenograftmodeller (eng. patient derived xenograft, PDX) (Baratta et al., 2015). BET-hämmarnas cancerhämmande verkan orsakas ibland av effekter på *MYC*-transkriptionen men studier har också visat att effekterna kan medieras av andra gener som är relevanta för cancer (Shi & Vakoc, 2014). Till exempel i multipel myelom antas det att uttrycket av *IL-6* spelar en roll i sjukdomens utveckling och det har visats att BET-hämmare kan tysta ned *IL-6* (Abedin et al., 2016). Dessutom hittade Zhang et al. (2016) att BET-hämning i höggradig serös äggstockscancer minskade uttrycket av onkogenen *FoxM1* (eng. *Forkhead box M1*) istället för att nedreglera *c-MYC*. I studien påvisades också att BRD4 amplifieras ofta i höggradig serös äggstockscancer, vilket korrelerade med dålig prognos (Zhang et al., 2016). I en *TP53*-muterad höggradig serös äggstockscancer cellinje upptäcktes lovande resultat: BET-hämning minskade bindningen av BRD4 till *WEE1*- och *TOPBP1*-promotorer, därvid minskade dessa geners uttryck betydligt (Karakashev et al., 2017). Även associationen av RNA polymeras II minskade vid dessa promotorer (Karakashev et al., 2017). *WEE1*-likt proteinkinase (*WEE1*) är ett viktigt protein för cellcykelns kontrollpunkt G2-M (eng. G2-M cell cycle checkpoint), eftersom det stoppar fortskridandet i cellcykeln vid händelse av DNA-skada. Däremot är DNA-topoisomeras-2-bindande protein 1 (*TOPBP1*) nödvändigt under DNA-replikation och vid signalering av DNA-skada (Karakashev et al., 2017). Minskandet av dessa proteins uttryck gör celler mer

känsliga mot Poly-(ADP-ribos)-polymerasinhibitorer (PARP-inhibitorer) och DNA-skadande läkemedel. PARP i sin tur reparerar DNA-skador; inhibitorer för detta protein har kombinerats med JQ1 med lyckat resultat (Karakashev et al., 2017). JQ1 har också studerats tillsammans med cisplatin, som är ett platinumbaserat anticancerläkemedel. Högt uttryck av *ALDH1A1*, som kodar för aldehyddehydrogenas (ALDH), orsakar resistans mot platinumbaserad kemoterapi. Behandling med JQ1 minskade uttrycket av *ALDH1A1* via hämning av BRD4 och ökade överlevnaden hos musmodeller när behandlingen kombinerades med cisplatin (Yokoyama et al., 2016). I undersökningen visades BRD4 binda till H3K27ac vid super-förstärkande gensekvenser nära *ALDH1A1*, behandling med JQ1 minskade både denna interaktion och interaktionen av dessa gensekvenser med promotorn, dvs. uppkomsten av den kromosomala öglan (Yokoyama et al., 2016). Således påverkar BET-hämning flera potentiella onkogener i olika cancertyper, vilket gör att BET-hämmare kan vara ett utmärkt läkemedel för olika cancertyper, inklusive OCCC.

3. Målsättning

Målsättningen för denna pro gradu-avhandling var att undersöka ifall BET-hämmare verkar specifikt på *ARID1A*-muterade klarcelliga äggstockscancerceller (OCCC). ARID1A, en komponent i SWI/SNF-komplexet, är ofta muterad i OCCC (Jones et al., 2010). BRD2, 3 och 4 har rapporterats associera med proteinerna JMJD6 och GLTSCR1 (Rahman et al., 2011) som interagerar med detta komplex (Miller et al., 2010; Middeljans, 2012). Dessutom har BRD2 visats binda i samma komplex som ARID1A vid *cyklin A*-promotorn (Denis et al., 2006). SWI/SNF-komplexet omstrukturerar nukleosomen och möjliggör transkription, replikation och reparation (Tang, Nogales, & Ciferri, 2010). Felreglering av dessa processer kan orsaka många typer av cancer, t.ex. tjock- och ändtarmscancer, bukspottkörtelcancer och äggstockscancer (Boyer, Walter, & Sørensen, 2016; Cox & Goding, 1991; Modrich & Lahue, 1996).

Det har rapporterats att BET-hämmare är speciellt effektiva i cellmodeller för höggradig serös äggstockscancer, som är en av de fem huvudtyperna av äggstockscancer (Zhang et al., 2016). OCCC-cellmodeller har inte undersökts systematiskt förut. Därför undersökte detta arbete huruvida OCCC-celler, specifikt *ARID1A*-mutanter, är känsliga för BET-hämning och ifall ARID1A påverkar responsen mot BET-hämmare. Resultaten från denna avhandling kan ta oss ett steg närmare personlig medicin inom äggstockscancer och därmed bättre vård av patienter.

De specifika frågeställningar var:

1. Är *ARID1A*-muterade celler mer känsliga för BET-hämmare än vildtypsceller?
För detta ändamål jämfördes responsen mot BET-hämmare hos vildtypsceller och celler med *ARID1A*-mutation.
2. Ifall *ARID1A*-mutanter är mer känsliga för BET-hämmare, är det då ARID1A som medierar responsen?
För att undersöka ifall vildtypsceller blir känsliga för BET-hämmare i frånvaro av ARID1A, transfekterades cellerna med RNA-molekyler mot *ARID1A*, varefter de behandlades med BET-hämmare.

3. Vilket BET-protein genomför effekten av BET-hämmarna?

Western blott på BRD2 och BRD4 utfördes på alla cellinjer för att undersöka skillnader i dessa proteins relativa nivåer i cellerna. Stora skillnader i proteinnivåerna kunde antyda vilket av dessa proteiner styr BET-hämmarnas verkan, när detta resultat kombineras med resultaten från dos-respons-experimenten.

4. Material och metoder

4.1 Cellkultur

4.1.1 Cellinjer

Cellinjerna som användes är de *ARID1A*-mutanta cellinjerna TOV21G, OVTOKO och OVMANA, och vildtypscellinjerna RMG-1 och ES-2. Alla valda cellinjer har sitt ursprung från OCCC. TOV21G-cellinjen är ursprungligen från en patient med långt gången OCCC (stadie III) (Provencher et al, 2000). OVTOKO har erhållits från en metastatisk tumör, medan OVMANA har erhållits från den primära äggstockscancertumören (Yanagibashi et al, 1997). RMG-1-cellinjen härstammar från ascites från en patient med äggstockscancer (Nozawa et al, 1988). ES-2-cellinjen har också erhållits från en patient med OCCC (Lau, Lewis, Ehsan, & Sikic, 1991). Dessa cellinjer är adherenta och har därför odlats på cellodlingsplattor (Falcon). Cellerna uppehölls i deras specifika odlingsmedium (tabell 2), och delades när de nått 80–90 % konfluens.

För lösgöring av TOV21G, OVTOKO, OVMANA och RMG-1 användes tempererat 0,25 % trypsin innehållande etylendiamintetraättiksyra (EDTA) i Hanks balanserade saltlösning (HBSS) (Biowest). Trypsin är ett enzym som katalyserar brytningen av peptidbindningar och därför förstör det proteinkomplexen som bildats under cellernas vidhäftning. EDTA är ett kelaterande medel som binder kalcium- och magnesiumjoner, som är viktiga för proteinkomplexen och möjliggör cellernas vidhäftning. EDTA gör trypsinbehandlingen effektivare. De ovannämnda cellinjerna inkuberades med trypsinlösningen vid 37 °C i 5–10 min. Däremot användes endast en egentillverkad EDTA-lösning (bilaga 1) till att lösgöra ES-2-cellerna: de inkuberades med lösningen vid rumstemperatur i ca 2 min, varefter de lösgjordes genom att pipettera odlingsmedium över cellerna.

Tabell 2. *ARID1A*-mutanta cellinjernas odlingsmedium och ursprung

| Cellinje | TOV21G | OVTOKO | OVMANA |
|--|---|--|--|
| Medium | 1:1 blandning av MCDB 105 (117500, Sigma-Aldrich) och medium-199 (M4530, Sigma-Aldrich) | RPMI 1640 (61870-010, Gibco) + GlutaMAX (L-Alanyl- Glutamin, 2,06 mM) | RPMI 1640 (61870-010, Gibco) + GlutaMAX (L-Alanyl- Glutamin, 2,06 mM) |
| Fetalt kalvserum (eng. fetal bovine serum, FBS) | 15 % | 10 % | 10 % |
| Pencillin/Streptomycin | 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin | 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin | 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin |
| HEPES | | 10 mM | 10 mM |
| L-Glutamin | | | |
| Ursprung | ATCC (CRL 11730) | JCRB Cell Bank (JCRB1048) | JCRB Cell Bank (JCRB1045) |

Tabell 3. Vildtypscellinjernas odlingsmedium och ursprung

| Cellinje | RMG-1 | ES-2 |
|--|--|--|
| Medium | Nutrient Mixture F-12 Ham (N8641, Sigma-Aldrich) | McCoy's 5a Medium Modified (30-2007, ATCC) |
| Fetalt kalvserum (eng. fetal bovine serum, FBS) | 10 % | 10 % |

| | | |
|-------------------------------|--|--|
| Pencillin/Streptomycin | 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin | 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin |
| L-Glutamin | 2 mM | |
| Ursprung | JCRB Cell Bank (JCRB0172) | ATCC (CRL 1978) |

4.1.2 Behandlingar

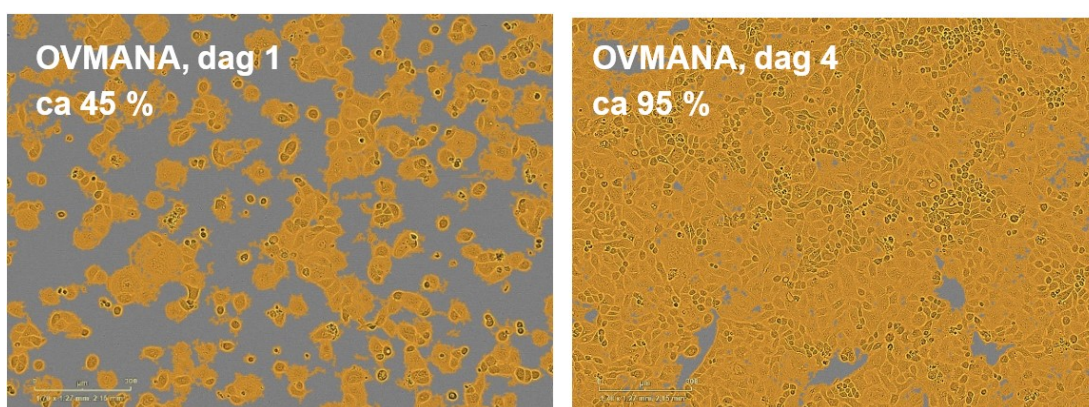
Varje cellinje behandlades med nocodazole, dimetylsulfoxid (DMSO) och BET-hämmarna JQ1 (MedChem Express) och iBET-762 (MedChem Express). Nocodazole depolymeriserar mikrotubuler vid höga koncentrationer, medan den vid låga koncentrationer hämmar den dynamiska instabiliteten hos mikrotubuler (Jordan, Thrower, & Wilson, 1992; Xu, Schwarz, & Ludueña, 2002). Nocodazole används som positiv kontroll eftersom dess verkan på mikrotubuler avbryter celcykeln, vilket leder till att cellernas proliferation upphör (Jordan et al, 1992). DMSO är ett utmärkt lösningsmedel och har använts i läkemedelslösningarna JQ1 och iBET-762. Den användes därför som negativ kontroll. Resultaten från behandlingarna med BET-hämmarna normaliserades mot resultaten från behandlingar med DMSO för att utesluta lösningsmedlets inverkan på cellernas viabilitet och proliferation. Den använda koncentrationen av DMSO var 0,3 %. Däremot behandlades cellinjerna med olika koncentrationer av BET-hämmarna, nämligen med 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000 och 10 000 nM. Koncentrationen av nocodazole som användes är den koncentration där cellerna varken prolifererar eller dör. Koncentrationen av nocodazole optimerades därför skilt för varje cellinje och finns till åskådande i tabell 4.

Tabell 4. Nocodazole-koncentrationen och cellantalet per brunn i 96-brunnsplatta som använts för de olika cellinjerna

| Cellinje | TOV21G | OVTOKO | OVMANA | RMG-1 | ES-2 |
|------------------------|---------------|---------------|---------------|--------------|-------------|
| Nocodazole | | | | | |
| koncentration | 200 | 300 | 500 | 2 000 | 300 |
| (nM) | | | | | |
| Cellantal/brunn | 2 000 | 5 000 | 9 000 | 16 000 | 1 500 |

4.1.3 Incucyte Zoom

Incucyte Zoom (Essen Bioscience) är ett automatiserat faskontrastmikroskop för mikroskopi av levande celler (37 °C, 5 % CO₂). Bildanalysen i instrumentet kvantifierar tätheten i cellkultur och anger värdet i procent (=konfluens %), och analyssekvensen optimeras skilt för varje celltyp (fig. 13). Med hjälp av instrumentet undersöktes cellernas proliferation i cellkultur efter behandlingar med BET-hämmare.

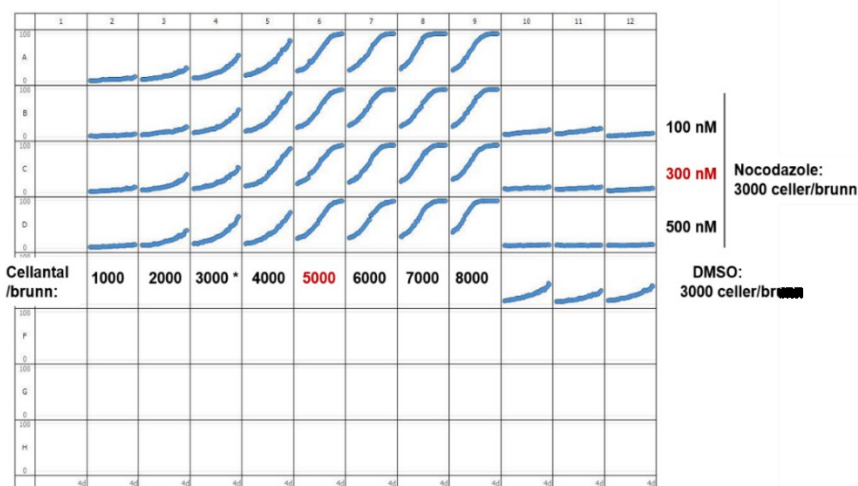


Figur 13. Incucyte Zooms konfluensmask för OVMANA. Bilderna är tagna under fyra dagars konfluensoptimering där cellantalet var 9000 celler/brunn.

Före behandlingar med BET-hämmare examinerades en ändamålsenlig täthet för varje cellinje i 96-brunnsplatta för experiment som pågår i fyra dagar (exempel i fig. 13 & 14). Det optimala cellantalet som sedan användes i dos-respons-experiment åskådliggörs i tabell 4. Figur 13 visar ett exempel på hur cellantalet och nocodazolekoncentrationen optimerats med Incucyte Zoom.

För dos-respons-experimenten odlades varje cellinje i en 96-brunnsplatta med olika tillsatser i vissa brunnar: fyra replikat av de åtta koncentrationerna som förberetts av JQ1 och iBET-762 samt DMSO och nocodazole. Under behandlingarna avbildades cellinjerna med Incucyte Zoom (faskontrast) under fyra dagar med 10x objektiv. Detta ger information om cellernas respons till behandlingarna.

OVTOKO konfluens- och nocodazoleoptimering under fyra dagars experiment



Figur 14. Konfluens- och nocodazoleoptimering för OVTOKO under fyra dagars experiment med Incucyte Zoom. I brunnarna A-, B-, C- och D2–9 har olika cellantal per brunn uppföljts. Det valda cellantalet 5000 celler/brunn är markerat med rött i brunnarna A–D6. Nocodazolekoncentrationen optimerades i brunnarna B-, C och D10–12 med cellantalet 3000 celler/brunn. Den valda koncentrationen 300 nM är markerad med rött. I brunnarna E10–12 har 3000 celler/brunn behandlats med DMSO som kontroll för nocodazoleoptimeringen.

4.1.4 WST-1

Med vattenlöslig tetrazoliumsolt-1-metoden (eng. water soluble tetrazolium salt 1, WST-1) bestäms cellers relativa viabilitet. Metoden går ut på att det bildas en färgad formazanprodukt av reagensets tetrazoliumsolt i metaboliskt aktiva celler. Formazanprodukten kan sedan avläsas vid 420–480 nm våglängd. Metoden valdes eftersom inkuberingstiden går att variera från 0,5–4 h samt flera mätningar vid olika tidpunkter kan avläsas. I och med detta kan den optimala tiden för mätning av cellernas viabilitet fås. Inkuberingstiden varierar beroende på bland annat cellinjen som används och tätheten i cellkultur.

I behandlingarnas slutpunkt, efter fyra dagar i Incucyte, utfördes WST-1-metoden för cellinjerna ES-2, RMG-1 och OVMANA för detektering av cellernas viabilitet. Cellerna inkuberades vid 37 °C med WST-1-reagenset enligt rekommendationen med förhållandet 1:10 av reagens och medium. Den använda inkuberingstiden för ES-2 var 1 h 15 min, för RMG-1 användes 1 h 50 min och för OVMANA 45 min. Resultaten avlästes med Hidex Sense vid våglängden 440 nm, som gav numeriska värden på

absorbans, som indikerar cellernas relativa viabilitet. Dessa värden användes för bestämning av dos-respons-kurvor och kalkylering av värden för den halv maximala hämmande koncentrationen (eng. half maximal inhibitory concentration, IC₅₀). En brunn innehållande cellodlingsmedium och WST-1-reagens användes som kontroll av bakgrund vid avläsning av resultaten.

4.1.5 MTT

Tiazolylblåtetrazoliumbromid-metoden (MTT) används liksom WST-1-metoden för bestämning av cellers viabilitet. Den baserar sig också på ett tetrazoliumsalt som reduceras av metaboliskt aktiva celler till en formazanprodukt. I denna metod krävs ett ytterligare steg före avläsning av resultat, nämligen tillsats av ett lösningsmedel för att lösa upp den bildade formazanprodukten. Denna metod valdes som tilläggsmetod eftersom OVTOKO-cellinjen inte gav tillförlitliga resultat med WST-1-metoden.

MTT-metoden användes för cellinjerna TOV21G och OVTOKO för bestämning av cellernas viabilitet samt ES-2 för att jämföra WST-1- och MTT-metoderna. Först upplöstes MTT-reagenset (Sigma-Aldrich) i PBS till en koncentration på 5 g/l. Cellerna inkuberades med reagenslösningen i förhållandet 1:10 av reagens och medium vid 37 °C i ca 2 h tills cellerna färgats lila. Därefter tömdes brunnarna från vätska och 100 µl DMSO tillsattes till varje brunn. DMSO fick verka vid rumstemperatur i mörker i ca 10 min under skakning för att lösa upp formazanprodukten som bildats när MTT-reagenset reagerat med metaboliskt aktiva celler. Resultaten avlästes med Hidex Sense vid våglängden 570 nm. Dos-respons-kurvor och kalkylering av IC₅₀-värden gjordes även av dessa resultat på basen av de numeriska absorbansvärdena. Som kontroll av bakgrundsabsorbans användes enbart DMSO.

4.1.6 Transfektion

För att undersöka ifall nedreglering av *ARID1A* leder till större känslighet mot BET-hämmare, transfekterades vildtypsceller med RNA-molekyler (eng. small interfering RNA, siRNA) som hämmar transkriptionen av *ARID1A*. Dessa RNA-molekyler fungerar genom att binda till *ARID1A*-mRNA via komplementär basparning, varefter

de inducerar nedbrytning av mRNA:t. Det här leder till att ingen modell längre finns tillgänglig för transkription av proteinet och fungerade därför som en dubbelkontroll för ARID1A- och BET-proteinernas roll i utvecklingen av OCCC. Nedregleringen av *ARID1A* kontrollerades genom western blott med en primär antikropp mot ARID1A.

RNA-molekylerna som användes för transfektionsexperimenten var RNA-molekyler som specifikt binder till *ARID1A*-mRNA (SMARTpool: Accell human ARID1A siRNA, Dharmacon) och kontrollmolekyler som binder ospecifikt i cellen (Accell non-targeting control pool, Dharmacon). Mängden RNA-molekyler i förpackningarna var 5 nmol, som löstes upp i sterilt RNA-fritt vatten (molecular biology reagent water, Sigma-Aldrich) till koncentrationen 100 μ M under skakning i 30 min. Denna lösning användes till att utspäda RNA-molekylerna i transfektionsmediumet Opti-MEM[®] (Invitrogen).

För transfektionsoptimering odlades ES-2- och RMG-1-celler i 12-brunnsplattor (Falcon) till 60–80 % konfluens. Transfektionen utfördes enligt Invitrogens RNAiMAX-transfektionsprotokoll. Transfektionslösningen som användes innehöll 130 nM RNA-molekyler (20 pmol) och Lipofectamine[®]-reagens (Invitrogen) i förhållandet 1:25 i Opti-MEM[®]-medium. Cellerna odlades i triplikat: ett triplikat med endast Lipofectamine[®]-reagens och Opti-MEM[®]-medium, ett annat triplikat med transfektionslösning innehållande RNA-molekyler specifika för *ARID1A* och ett tredje triplikat med transfektionslösning innehållande ospecifika RNA-molekyler. Cellodlingen pågick under tre dagar, varefter cellerna samlades upp i provrör (Eppendorf) med Laemmli-buffert för analys med western blott-metoden.

För läkemedelsundersökningar med transfekterade celler odlades ES-2-celler under 24 h i 35 mm odlingsplatta (Falcon), varefter de transfekterades med transfektionslösning och inkuberades under 8 h. Fyra plattor användes för förhållandena med RNA-molekyler, där två plattor odlades med RNA-molekyler specifika för *ARID1A* (härnäst sk. ARID1A-plattor) och två plattor innehållande ospecifika RNA-molekyler (kontrollplattor). En ARID1A-platta och en kontrollplatta delades efter 8 h inkubering i skilda 96-brunnsplattor och inkuberades i 24 h. I dessa plattor odlades även fyra brunnar med vildtyps-ES-2-celler som nästa dag behandlades med Lipofectamine[®]-reagens och Opti-MEM[®]-medium som kontroll. Cellerna från kontroll- och ARID1A-plattorna behandlades med BET-hämmarna såsom i tidigare nämnda undersökningar,

varefter plattorna odlades i Incucyte Zoom och analyserades med MTT-metoden. Strax före MTT-metoden samlades ändå några prov från 96-brunnspattan för western blott-analys, likaså samlades prov från de 35 mm plattorna som odlats tidigare och förblivit oanvända. Nedregleringen av ARID1A i ES-2 kontrollerades slutligen genom western blott med en primär antikropp mot ARID1A.

4.2 Western blott

Western blott är en mycket använd metod inom cell- och molekylär biologi för identifiering av specifika proteiner. Ett celllysats som innehåller många olika proteiner separeras först på basen av proteinernas storlek. Härfter flyttas proteinerna över på ett membran som slutligen behandlas med en primär och en sekundär antikropp samt ett förstärkt kemiluminescent substrat för visualisering av proteinet av intresse. Avläsningen av signalen från det kemiluminescenta substratet utförs antingen genom att framkalla en film av membranet i mörkrum eller genom att använda ett bildsystem för western blott som avläser signalen från membranet, t.ex. iBright (Invitrogen) som jag använt i mitt arbete.

4.2.1 Cellysering

De relativa BET-nivåerna av BRD2 och BRD4 i alla cellinjer bestämdes med western blott. För att kontrollera ARID1A-mutanterna och transfektionen av vildtypscellinjerna RMG-1 och ES-2, blottades även ARID1A för alla cellinjer.

För western blott samlades prov på 400 000 celler av alla cellinjer i 1,5 ml tuber (Eppendorf), varefter de lyserades i 200 µl Laemmli-lysisbuffert (bilaga 1). Laemmli-lysisbufferten innehåller natriumdodekylsulfat (eng. sodium dodecyle sulphate, SDS) som är en stark anjonisk detergent. SDS denaturerar proteiner genom att bryta icke-kovalenta jon-joninteraktioner och tränga in sig mellan hydrofobiska regioner, vilket leder till att proteinerna förlorar sin tredimensionella struktur och blir linjära. SDS gör även proteinerna negativt laddade. Laemmli-lysisbufferten innehåller även beta-merkaptoetanol som bryter sulfidbindningar både mellan och inom proteiner, således möjliggör den att alla proteiner i lösningen denatureras, inkluderande subenheter i stora komplex. Denatureringen säkerställdes ännu genom upphettning av lösningen

vid 98 °C i 10 min. Tack vare SDS och beta-merkaptoetanol verkar varken proteinernas laddning eller form separeringen som beskrivs härnäst.

4.2.2 Natriumdodekylsulfatpolyakrylamidgelelektrofores (SDS-PAGE) och immunoblotting

För separeringen av proteinerna användes färdiggjutna gelplattor med 7,5 % polyakrylamid (Bio-Rad). Gelplattorna innehåller två olika geler: en övre och en undre gel. Den övre gelen samlar proteinerna till samma utgångsläge, dvs. till fasen mellan den övre och undre gelen, för att säkerställa att proteinerna separeras jämnt i gelen. Den undre gelen separerar proteinerna enligt storlek och dess koncentration av polyakrylamid bestämmer porstorleken i gelen. En låg koncentration av polyakrylamid leder till en stor porstorlek, den separerar därmed stora proteiner bäst. Den använda 7,5 % koncentrationen separerar proteiner som är större än 30 kD. Storleken av BRD2 är ca 90 kD, BRD4 är ca 150 kD och ARID1A är ca 240 kD. Som laddningskontroll användes alfa-tubulin med storleken 50 kD.

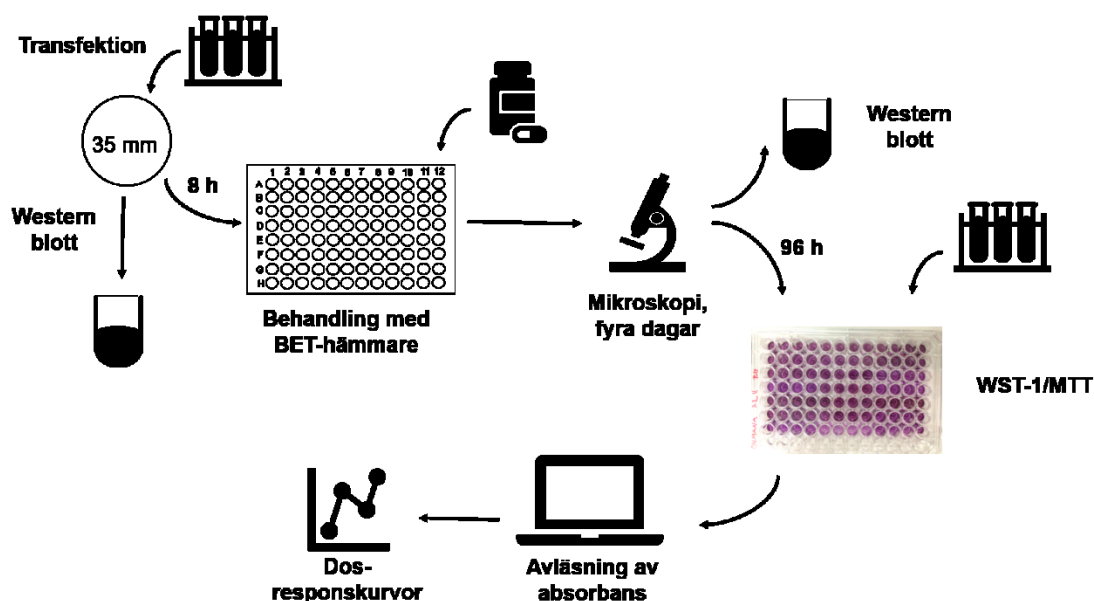
Tabell 5. Primära antikroppar för western blott

| Primär antikropp | Utspädning | Sekundär antikropp | Tillverkare | Katalog-nummer |
|-------------------------|-------------------|---------------------------|--------------------|-----------------------|
| Anti-alfa-tubulin | 1:1000 | Mus | Cell Signaling | 3873S |
| Anti-BRD2 | 1:1000 | Kanin | Cell Signaling | D89B4 |
| Anti-BRD4 | 1:1000 | Kanin | Abcam | ab128874 |
| Anti-ARID1A | 1:1000 | Kanin | Sigma-Aldrich | HPA005456 |

Tabell 6. Sekundära antikroppar för western blott

| Sekundär antikropp | Utspädning | Tillverkare | Katalog-nummer |
|-----------------------------------|-------------------|--------------------|-----------------------|
| Mus: | | | |
| Anti-mouse IgG, HRP conjugate | 1:10 000 | Promega | W4021 |
| Kanin: | | | |
| Anti-rabbit IgG, HRP conjugate | 1:10 000 | Promega | W4011 |

Proteinerna separerades med natriumdodekylsulfatpolyakrylamidgelelektrofores (SDS-PAGE), där de negativt laddade proteinerna vandrade mot den positivt laddade elektroden, dvs. anoden. Härmed skedde separationen enligt molekylvikt, där små proteiner förflyttades i gelen i snabbare takt än stora proteiner. De separerade proteinerna överflyttades sedan till ett cellulosa membran med hjälp av en elektrisk spänning med våt överföring-metoden (eng. wet-transfer). Recept på buffertarna som användes för SDS-PAGE och överföringen finns till påseende i bilaga 1. Membranet inkuberades därefter med fettfri mjölk i fosfatbuffrad saltlösning med 0,1 % Tween 20 (eng. phosphate buffered saline with Tween 20, PBST), som blockerar ospecifika bindningsställen. Efter blockeringen inkuberades membranet under 1 h med primära antikroppar mot BRD2, BRD4, ARID1A och alfa-tubulin (tabell 5). Membranet tvättades tre gånger 10 min med 0,1 % PBST, varefter den inkuberades med pepparrotsperoxidaskonjugerade (eng. horseradish peroxidase conjugated, swe. HRP-konjugerade) sekundära antikroppar mot proteinet av intresse. För visualisering av de HRP-antikroppsbundna proteinerna inkuberades membranet i ett förstärkt kemiluminescent substrat (ECL), som visualiserar HRP. Signalen, som korresponderade endast till det önskade proteinet i membranet, detekterades med iBright (Invitrogen). Intensiteten av signalen var större ju mer protein det fanns i cellerna.



Figur 15. Sammanfattning på de använda metoderna för dos-respons-experiment. Transfektionsexperimenten har endast utförts på ES-2, därvid började de flesta experiment från behandlingar med BET-hämmare. Märk väl att western blott-stegen i detta fall berör endast transfektionsexperiment. I andra fall togs proven under sedvanlig cellodling i 10 cm odlingsplattor.

4.3 Statistik

Alla experiment upprepades minst tre gånger för att undvika slumpmässiga resultat. Absorbansvärdena från viabilitetsmetoderna normaliserades mot DMSO- eller obehandlade prov, därvid erhöles ett procentuellt tal för viabilitet. Normaliseringen mot obehandlade prov gjordes endast för transfektionsexperimenten i figurerna 33–35 i avsnitt 5.4. Dos-respons-kurvorna och IC50-värden bestämdes i GraphPad Prism genom att först transformera de normaliserade absorbansvärdena till logaritmisk skala, där x-värdena representerar läkemedelsdosen. Efter transformeringen valdes icke-linjär regression med extra kvadratsummors F-test och parametern logIC50.

I de grupperade graferna för BET-hämmarna analyserades skillnader mellan resultaten av DMSO-kontrollen och de relevanta koncentrationerna av BET-hämmarna statistiskt med multipla t-tester (GraphPad Prism). Endast justerade p-värden $<0,05$ räknades som signifikanta. Spridningen i graferna visar medelvärdeets medelfel (eng. standard error of the mean, SEM).

5. Resultat

5.1 Skillnader mellan viabilitetsmetoderna MTT och WST-1

MTT-metoden baserar sig på tetrazoliumsaltet 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid (MTT), som reduceras av metaboliskt aktiva celler till en blå formazanprodukt med hjälp av NADH-beroende oxidoreduktas och dehydrogenaser (Berridge, Herst, & Tan, 2005; Mosmann, 1983; Schröterová et al., 2009). Eftersom endast metaboliskt aktiva celler reducerar tetrazoliumsaltet är färgintensiteten, och således absorbansen, av den lösta formazanprodukten direkt proportionell mot antalet levande celler (Mosmann, 1983; Schröterová et al., 2009). Formazanprodukten i MTT-metoden är endast till viss del lös i cellodlingsmedium och MTT-metoden kräver därför ett lösningsmedel, t.ex. isopropanol eller annan alkohol, före avläsning av resultat (Mosmann, 1983). Mosmann (1983) visar att signalen av MTT-reagenset tilltar från en inkuberingstid på ½ h till 2 h och fortsätter att öka endast marginellt efter detta upp till 4 h.

Tetrazoliumsaltet som används för WST-1-metoden är natrium-5-(2,4-disulfofenyl)-2-(4-jodfenyl)-3-(4-nitrofenyl)-2H-tetrazolium, inre salt. Fördelen med WST-1-metoden är att den gula formazanprodukten som bildas efter reduktion är vattenlös, således krävs inget ytterligare steg för att lösa upp produkten före avläsning av resultat (Schröterová et al., 2009). En annan viktig skillnad mellan MTT och WST-1 är cellens sätt att reducera de specifika tetrazoliumsalty. I MTT tas saltet åtminstone delvis in av cellen för reduktion medan saltet reduceras extracellulärt genom elektrontransport över cellmembranet i WST-1 (Berridge et al., 2005).

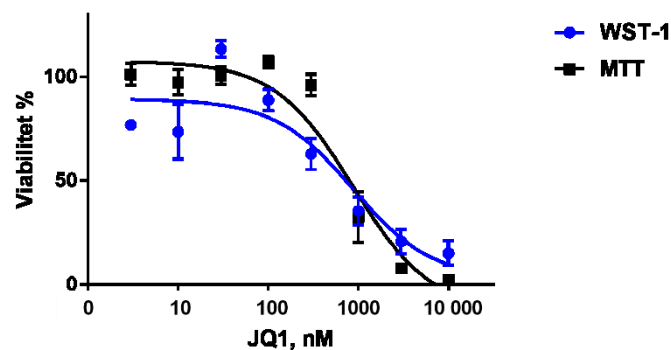
Eftersom WST-1 inte gav tillförlitliga resultat för alla cellinjer, ändrades viabilitetsmetoden till MTT. För att jämföra resultaten från dessa metoder sinsemellan, utfördes båda metoderna på ES-2 och resultaten analyserades med GraphPad Prism för bestämning av dos-respons-kurvor och IC50-värden. Dos-respons-kurvornas y-axel visar cellernas procentuella viabilitet där 100 % representerar en sedvanlig proliferationshastighet, medan 0 % representerar så gott som döda celler.

Från figur 16 kan avläsas en stor men icke-signifikant skillnad mellan responsen mot BET-hämmarna när cellerna analyserats med MTT respektive WST-1. MTT-kurvan börjar avta vid ungefär samma koncentration som WST-1-kurvan men MTT-kurvans form är betydligt brantare, därvid blir de kalkylerade IC50-värdena olika. Detta gäller

för både JQ1 och iBET-762. Märk väl att WST-1-kurvan för JQ1 har fler avvikande punkter (sk. uteliggare, eng. outliers) som påverkar tillförlitligheten av resultaten. För IC₅₀-värdena gav WST-1 ett betydligt lägre värde för JQ1 jämfört med MTT: 685 nM respektive 980 nM. En ännu större skillnad kan ses mellan iBET, där WST-1 gav värdet 2 690 nM medan MTT gav värdet 5 530 nM. Dock ser kurvornas form någotsånär likadan ut vid jämförelse av metoderna. I härpå följande jämförelser har data från MTT använts för ES-2.

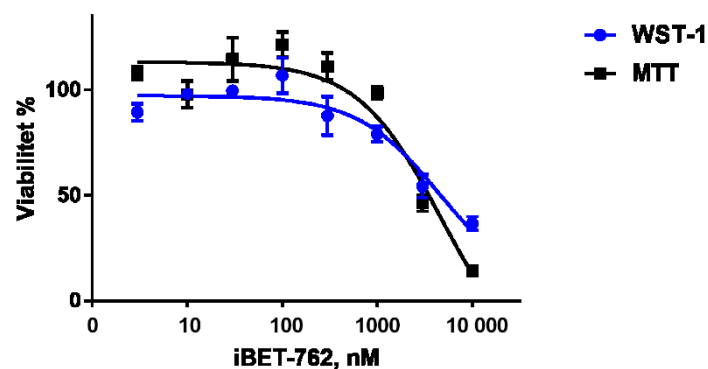
A

ES-2 dos-responsjämförelse av WST-1 och MTT



B

ES-2 dos-responsjämförelse av WST-1 och MTT



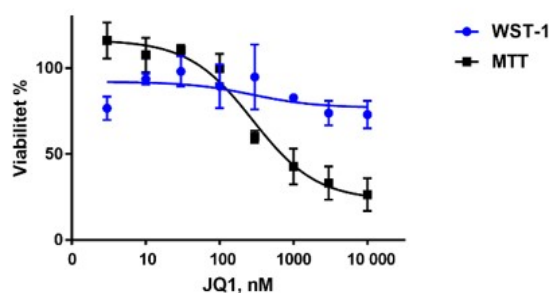
Figur 16. Dos-respons-jämförelse för (A) JQ1 och (B) iBET-762 mellan metoderna WST-1 och MTT hos cellinjen ES-2. Datat erhöles efter fyra dagars experiment (96 h). För iBET-762 med metoden MTT var antalet experiment fyra (N=4) medan data för resten är tagna från tre experiment (N=3). Inga signifikanta skillnader påvisades varken för JQ1 (p-värde: 0,50) eller iBET-762 (p-värde: 0,31).

5.2 WST-1 fungerade inte som metod för att klarlägga viabiliteten hos OVTOKO

WST-1 gav inga tillförlitliga resultat hos OVTOKO när viabiliteten bestämdes. Som kan ses i figur 17 visar mätpunkterna på stor variation och ingen förändring på viabilitet mellan olika koncentrationer. Detta leder till att inget tillförlitligt IC₅₀-värde kan uträknas: för JQ1 gav WST-1-datat ett IC₅₀-värde på 2 320 nM medan den för iBET-762 gav ett betydligt lägre värde på 550 nM. Stora skillnader i proliferationen kunde ändå ses på basen av Incucyte Zoom-data (fig. 17). Därför utfördes MTT istället, vilket visade en bra dos-respons för OVTOKO mot BET-hämmarna (fig. 17). Dos-respons med MTT gav ett IC₅₀-värde på 260 nM för JQ1 och 345 nM för iBET-762.

A

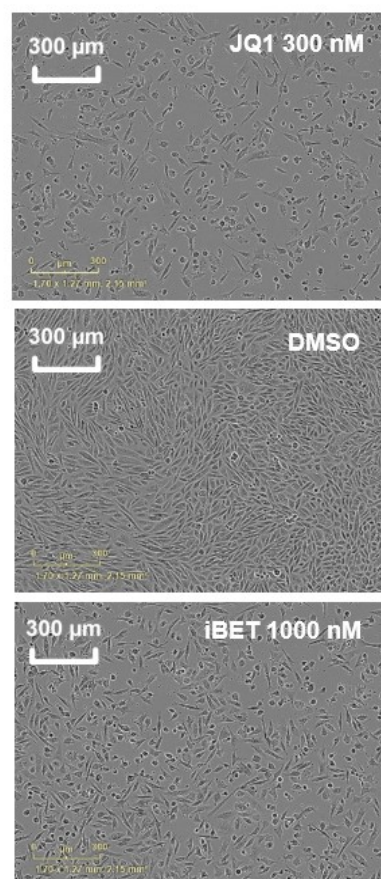
OVTOKO dos-responsjämförelse av WST-1 och MTT



IC₅₀, JQ1
WST-1 = 2320 nM
 MTT = 260 nM

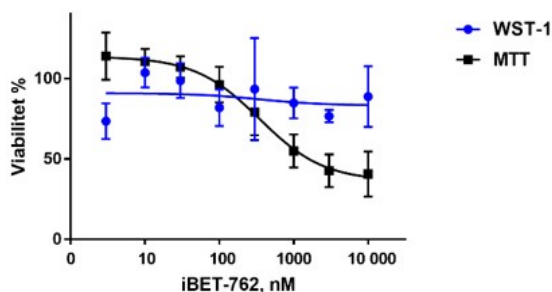
B

OVTOKO-bilder från experiment med WST-1 efter 96 h



C

OVTOKO dos-responsjämförelse av WST-1 och MTT



IC₅₀, iBET-762
WST-1 = 550 nM
 MTT = 345 nM

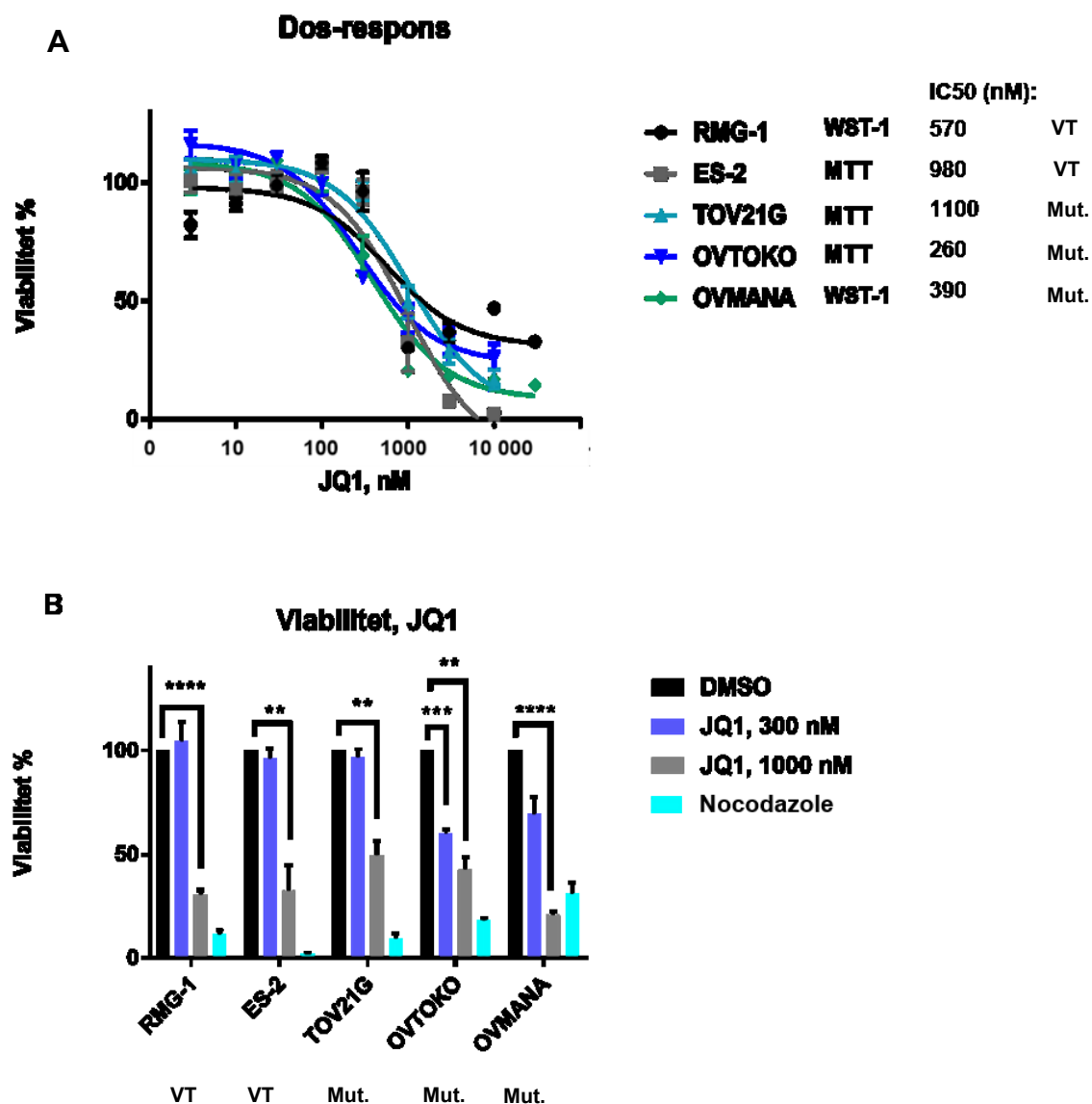
Figur 17. Stöd för att WST-1 inte detekterar skillnader i viabilitet hos OVTOKO och en jämförelse med MTT. A & C jämför dos-respons-grafer som fått från WST-1- (N=2) respektive MTT-data (N=3). A visar skillnaden för BET-hämmaren JQ1 medan C visar för iBET-762. Bilder från experiment med WST-1 syns i B-delen. Stora skillnader i proliferation hos celler behandlade med JQ1 respektive iBET-762 kan påvisas i jämförelse med kontrollen DMSO. Data för dos-respons-kurvorna och bilderna erhöles efter 4 dagars experiment (96 h).

5.3 *ARID1A*-mutation påverkar inte enskilt känsligheten för BET-hämmare

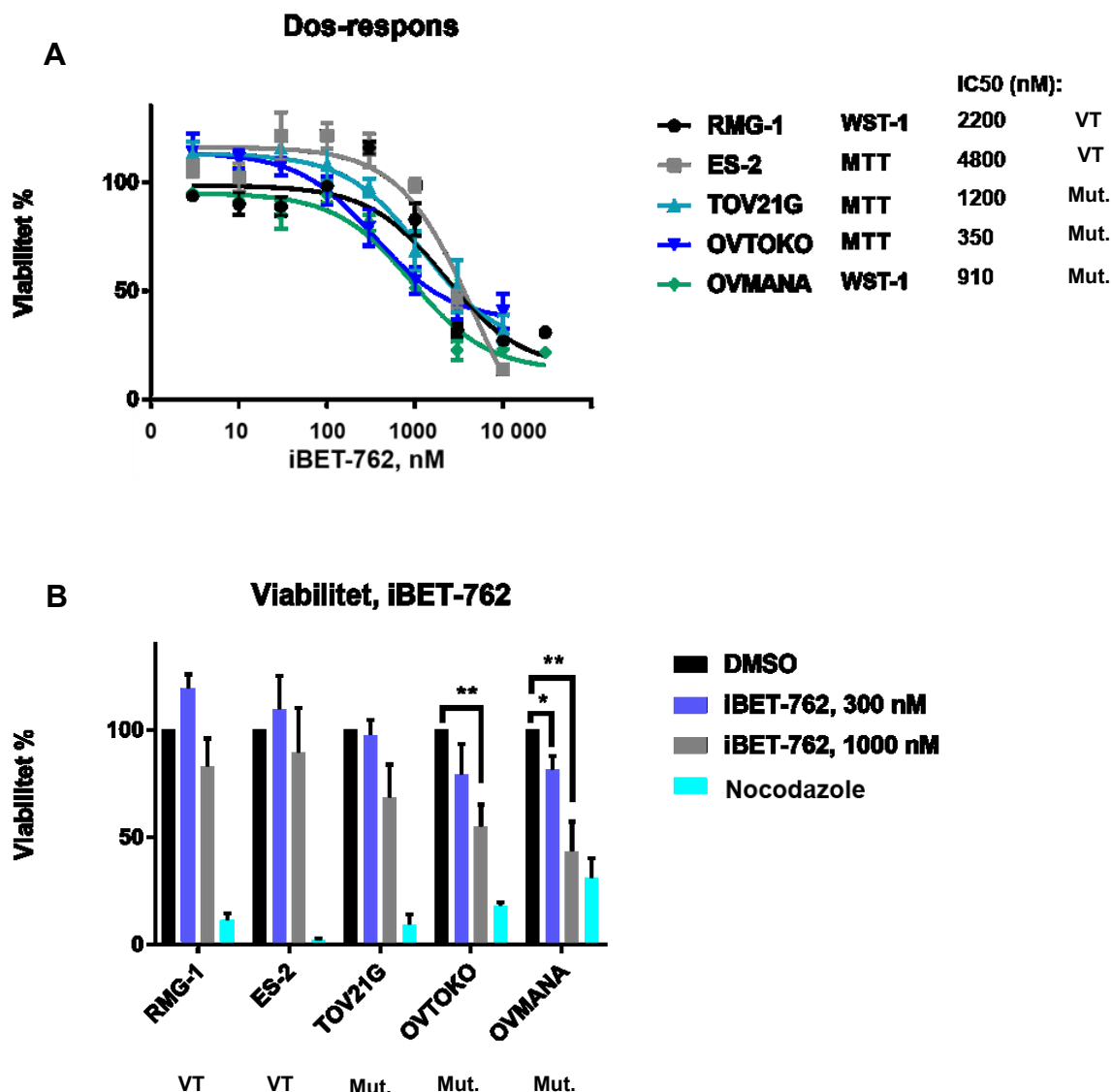
De undersökta BET-hämmarna var JQ1 och iBET-762. Känsligheten för hämmarna studerades med följande *ARID1A*-muterade cellinjer: TOV21G, OVTOKO och OVMANA. Deras känslighet mot hämmarna jämfördes med känsligheten hos vildtypscellinjerna RMG-1 och ES-2. Både cellernas proliferation under fyra dagar och viabilitet efter fyra dagars experiment mättes. Dessa biologiska funktioner användes som antydning på känslighet mot hämmarna.

5.3.1 De muterade cellinjerna OVTOKO och OVMANA är betydligt känsligare för BET-hämmarna än TOV21G och vildtypscellinjerna

Dos-respons-kurvorna visar att viabiliteten för OVTOKO och OVMANA börjar avta vid en mindre koncentration av både JQ1 och iBET-762 jämfört med vildtypscellinjerna RMG-1 och ES-2 samt den tredje *ARID1A*-muterade cellinjen TOV21G (fig. 18 & 19). Detta ger OVTOKO och OVMANA ett betydligt lägre IC50-värde, som beskriver den koncentrationen där den hämmande effekten av ett läkemedel är 50 % av den sedvanliga biologiska funktionen. Observera att viabilitetsmetoderna WST-1 och MTT inte är direkt jämförbara och att alla cellinjer viabilitet inte har mätts med samma metod. För RMG-1 och OVMANA användes WST-1, medan för ES-2, OVTOKO och TOV21G användes MTT. Märk väl ändå att vildtypscellinjerna RMG-1 och ES-2 har mätts med olika metoder och därför är alla muterade cellinjer direkt jämförbara med en vildtypscellinje. Enskilda dos-respons-kurvor hos varje cellinje för JQ1 finns till påseende i figurerna 19–23. Figurerna visar även ändpunktsbilder efter fyra dagar.



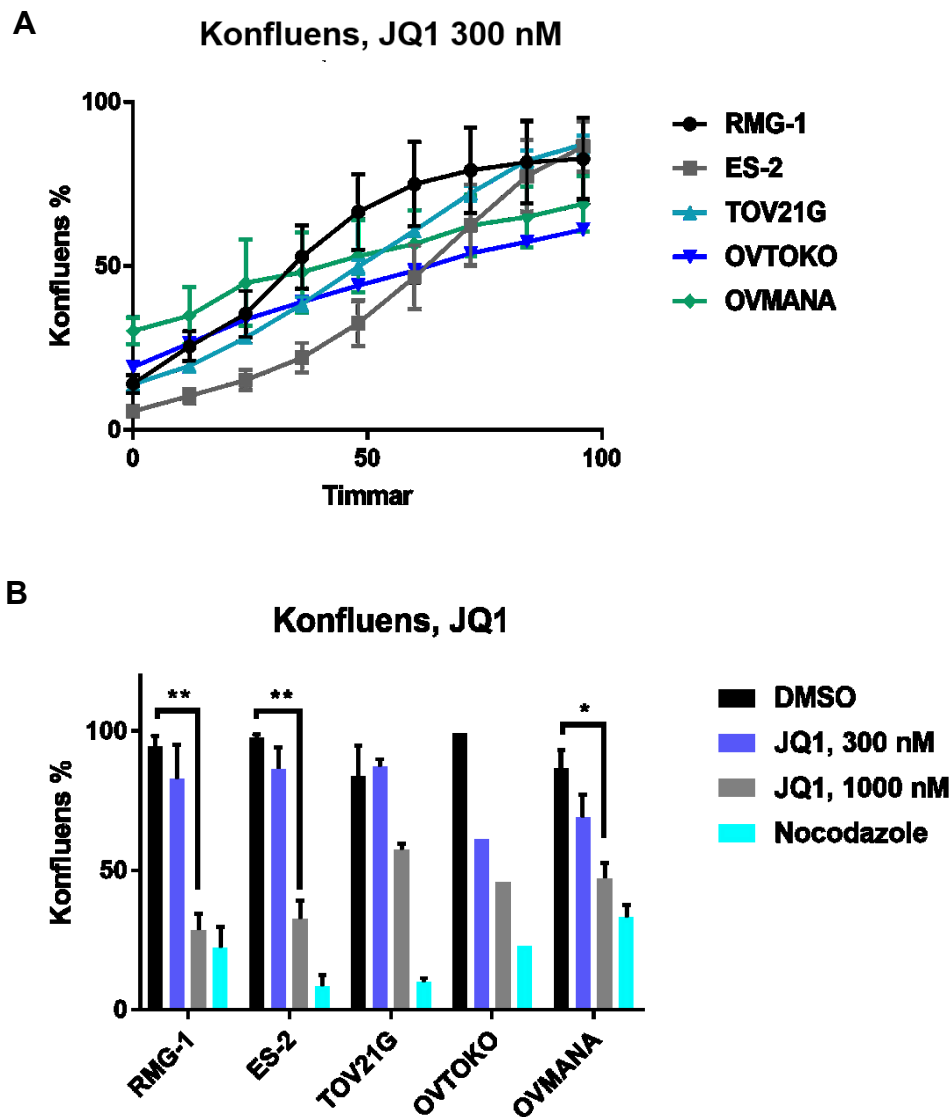
Figur 18. De olika cellinjernas känslighet mot JQ1 med viabilitet som mått efter fyra dagars behandlingar med BET-hämmaren. (A) Dos-respons-grafer med alla koncentrationer av JQ1 och de beräknade IC50-värdena. Vildtypscellinjerna (VT) RMG-1 och ES-2 är markerade i gråskala. De muterade cellinjerna TOV21G, OVTOKO och OVMANA är markerade med "Mut." (B) Skillnader i viabilitet med koncentrationerna 300 nM och 1000 nM jämfört med DMSO. Nocodazole visar nivån där cellerna inte delar sig längre. Signifikanta resultat är markerade med en eller flera asterisker på basen av justerade p-värden (300 nM: OVTOKO – 0,0002. 1000 nM: RMG-1 – 0,00003; ES-2 – 0,005; TOV21G – 0,004; OVTOKO – 0,002; OVMANA – 0,000005).



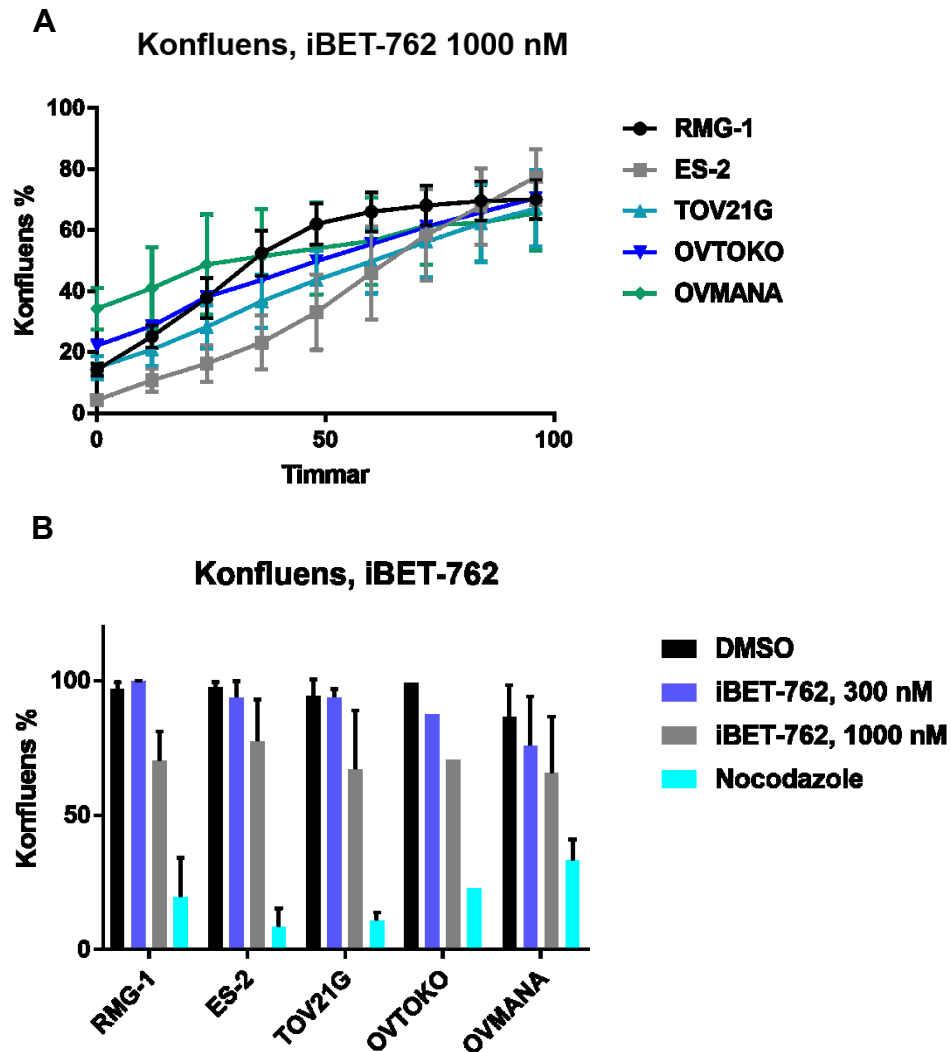
Figur 19. De olika cellinjernas känslighet mot iBET-762 med viabilitet som mått efter fyra dagars behandlingar med BET-hämmaren. (A) Dos-respons-grafer med alla koncentrationer av iBET-762 och de beräknade IC₅₀-värdena. Vildtypscellinjerna (VT) RMG-1 och ES-2 är markerade i gråskala. De muterade cellinjerna TOV21G, OVTOKO och OVMANA är markerade med "Mut." (B) Skillnader i viabilitet med koncentrationerna 300 nM och 1000 nM jämfört med DMSO. Nocodazole visar nivån där cellerna inte delar sig längre. Signifikanta resultat är markerade med en eller flera asterisker på basen av justerade p-värden (300 nM: OVMANA – 0,036. 1000 nM: OVTOKO – 0,008; OVMANA – 0,008).

Alla cellinjers proliferation mättes åtminstone under ett av tre dos-respons-experiment med Incucyte Zoom under fyra dagar. Proliferationen mättes med faskontrastmikroskopi som konfluens. OVTOKO och OVMANA verkar vara betydligt känsligare för JQ1 än de andra cellinjerna (fig. 20). Som det framgår ur figur 20, ökar konfluensen för OVTOKO och OVMANA med ca 30 % under fyra dagar,

medan de andra cellinjernas konfluens ökar med ca 70 % under samma tid när dessa har behandlats med 300 nM av JQ1 (fig.). Notera dock att OVTOKO:s konfluens har endast mätts under ett experiment och dess resultat kan därför inte ses som statistiskt signifikant. Inga signifikanta resultat för iBET-762 noterades på basen av cellernas konfluens (fig. 20).

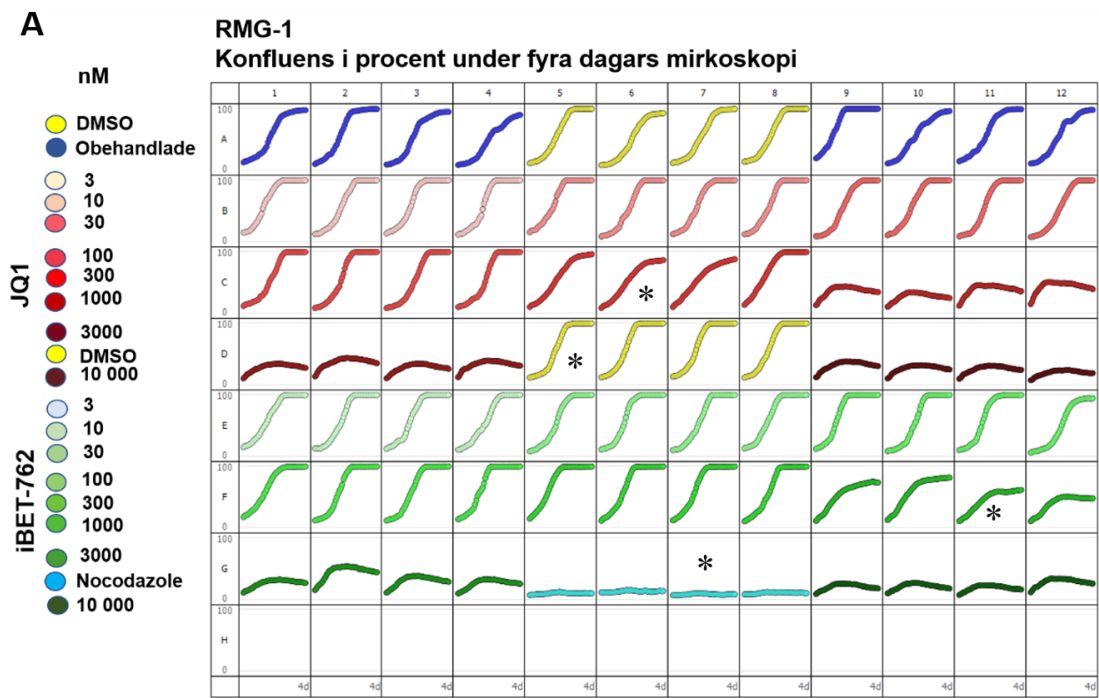


Figur 20. De olika cellinjernas känslighet mot JQ1 på basen av konfluens efter fyra dagars behandlingar med BET-hämmaren. (A) Varje cellinjes proliferation mätt som konfluens under fyra dagars behandling med JQ1 med koncentrationen 300 nM. (B) Skillnader i konfluens med koncentrationerna 300 nM och 1000 nM jämfört med DMSO. Nocodazole visar nivån där cellerna inte delar sig längre. Signifikanta resultat är markerade med en eller flera asterisker på basen av justerade p-värden (1000 nM: RMG-1 – 0,0025; ES-2 – 0,0025; OVMANA – 0,021).

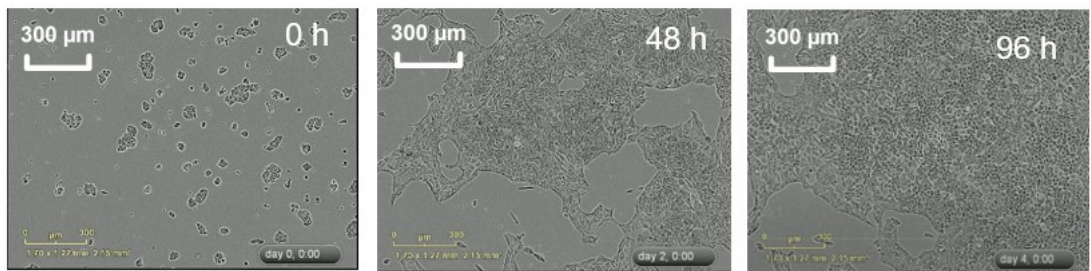


Figur 21. De olika cellinjernas känslighet mot iBET-762 på basen av konfluens efter fyra dagars behandlingar med BET-hämmaren. (A) Varje cellinjes proliferation mätt som konfluens under fyra dagars behandling med iBET-762 med koncentrationen 1000 nM. (B) Skillnader i konfluens med koncentrationerna 300 nM och 1000 nM jämfört med DMSO. Nocodazole visar nivån där cellerna inte delar sig längre. Inga signifikanta resultat erhöles.

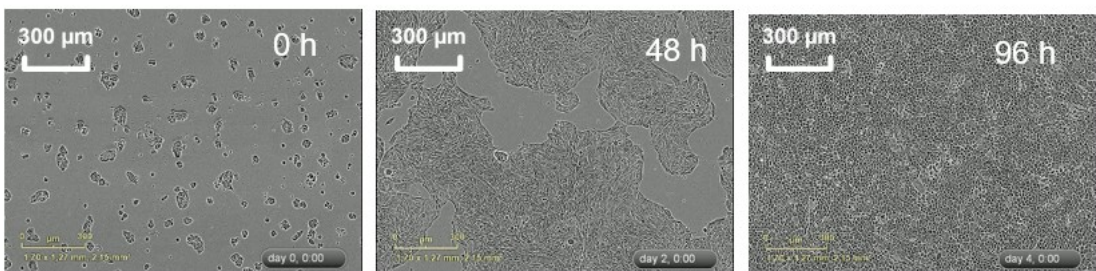
Nedan finns samlade resultat från Incucyte Zoom för alla cellinjer. Dessa visar med bilder och konfluensgrafer för varje replikat samma resultat på konfluens som ovan. Här syns det tydligt att OVTOKO är känsligast för BET-hämning, speciellt för JQ1 vid 300 nM (fig. 25).



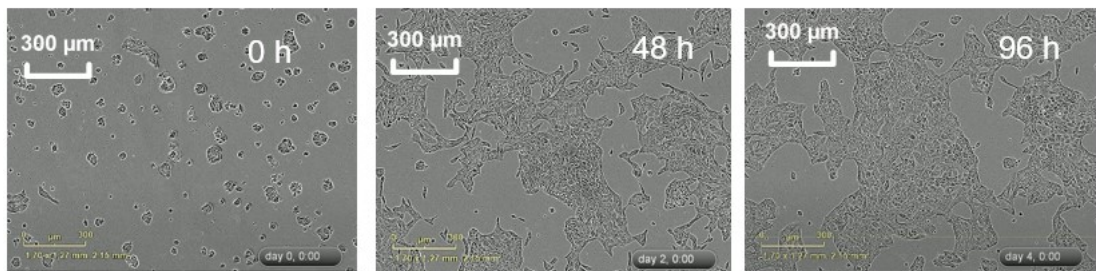
B RMG-1, JQ1 300 nM

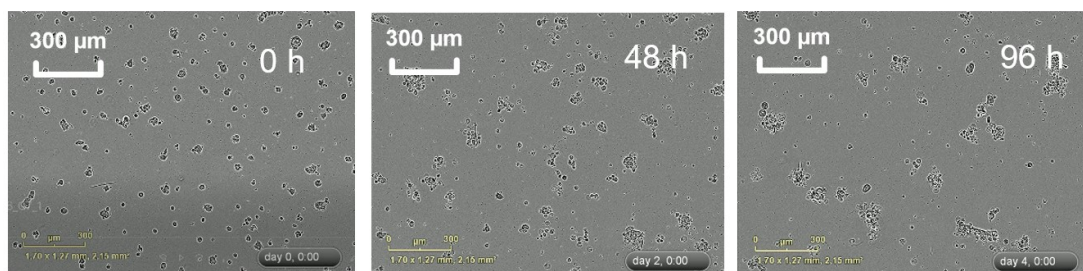


C RMG-1, DMSO

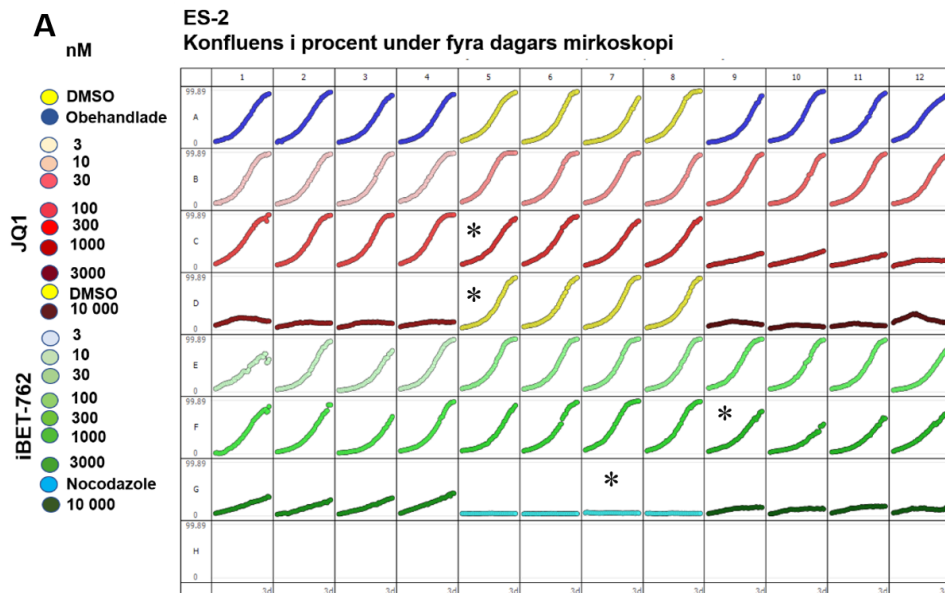
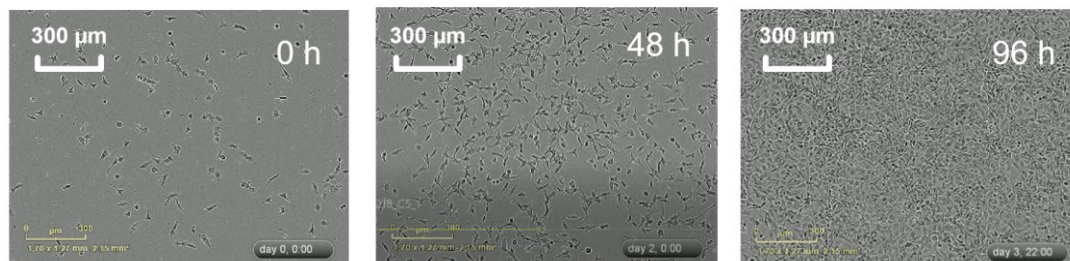


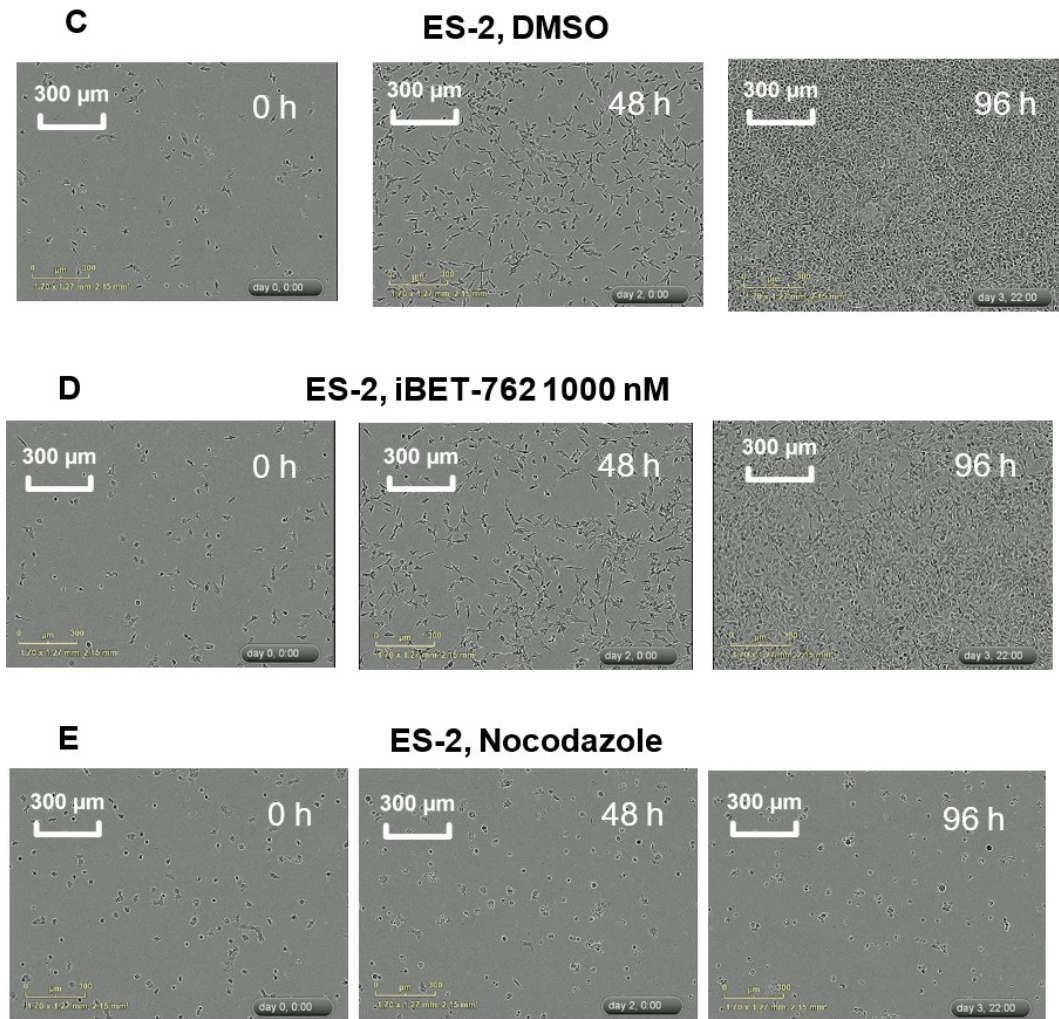
D RMG-1, iBET-762 1000 nM



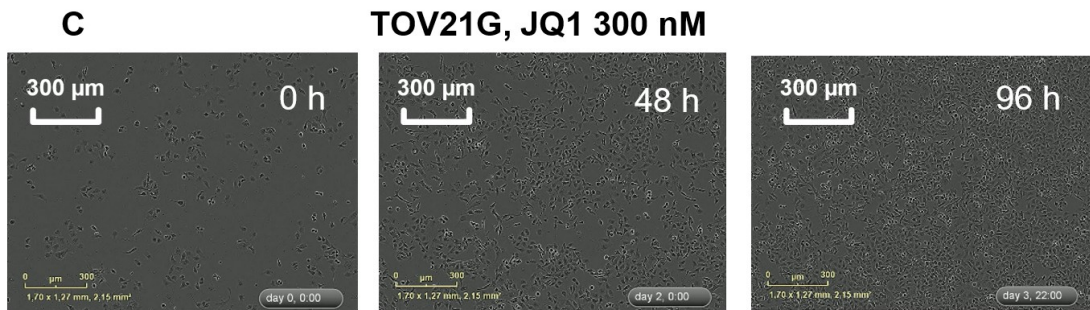
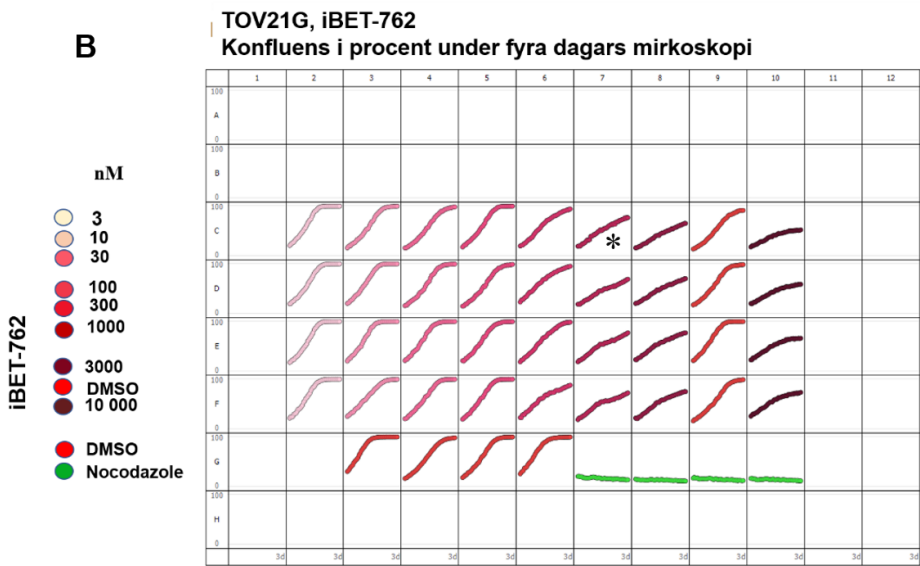
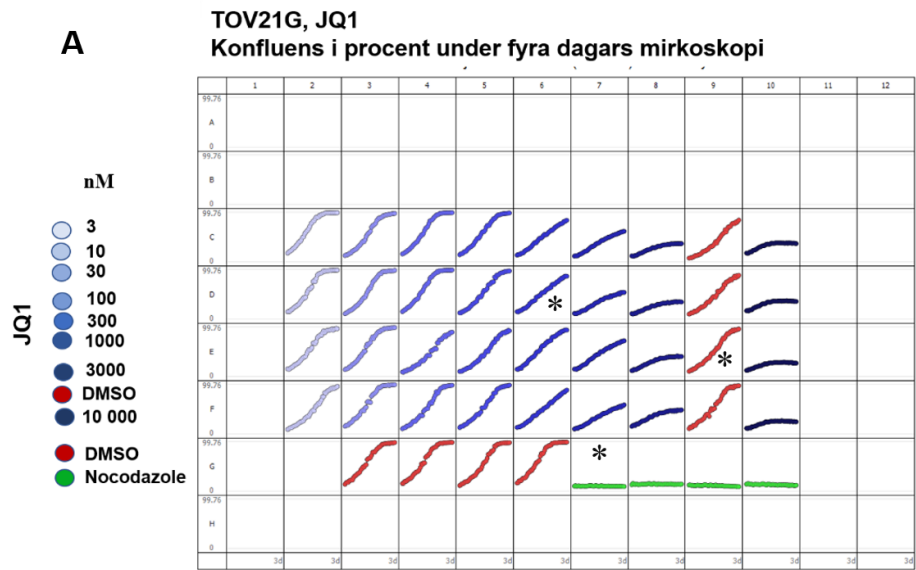
E**RMG-1, Nocodazole**

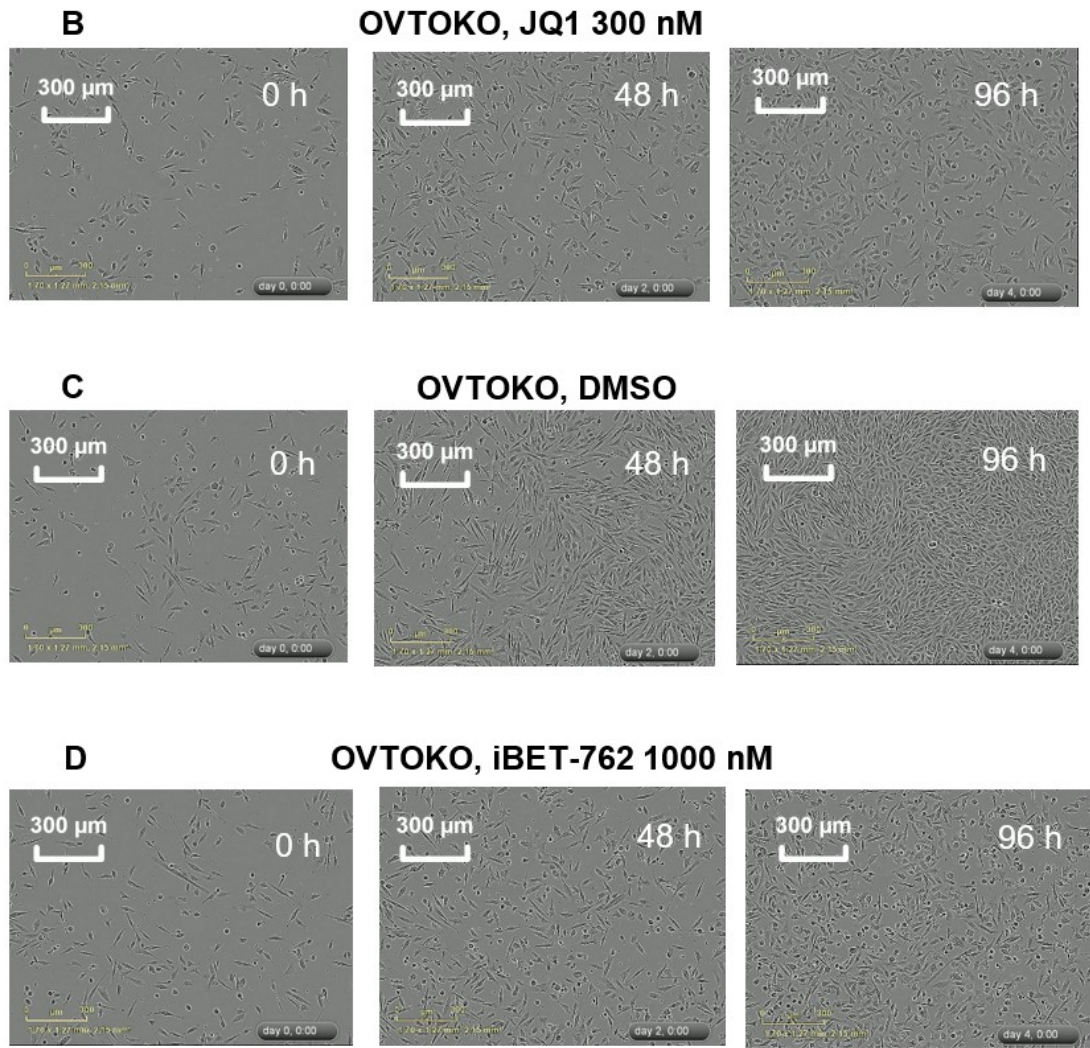
Figur 22. RMG-1-cellers känslighet mot JQ1 och iBET-762 på basen av konfluens efter fyra dagars behandlingar med BET-hämmarna. (A) Konfluensgraf med alla koncentrationer av BET-hämmarna samt kontroller som kvadruplikat (horisontalt). Grafen visar konfluensen för varje brunn under fyra dagar. (B, C, D & E) Representativa bilder på RMG-1 behandlade med BET-hämmarna JQ1 och iBET-762 och kontrollerna DMSO och Nocodazole. Bilderna visar proliferationen för vartannat dygn under fyra dagar. Asteriskerna i konfluensgrafen (A) visar de brunnar därifrån bilderna är tagna.

**B****ES-2, JQ1 300 nM**

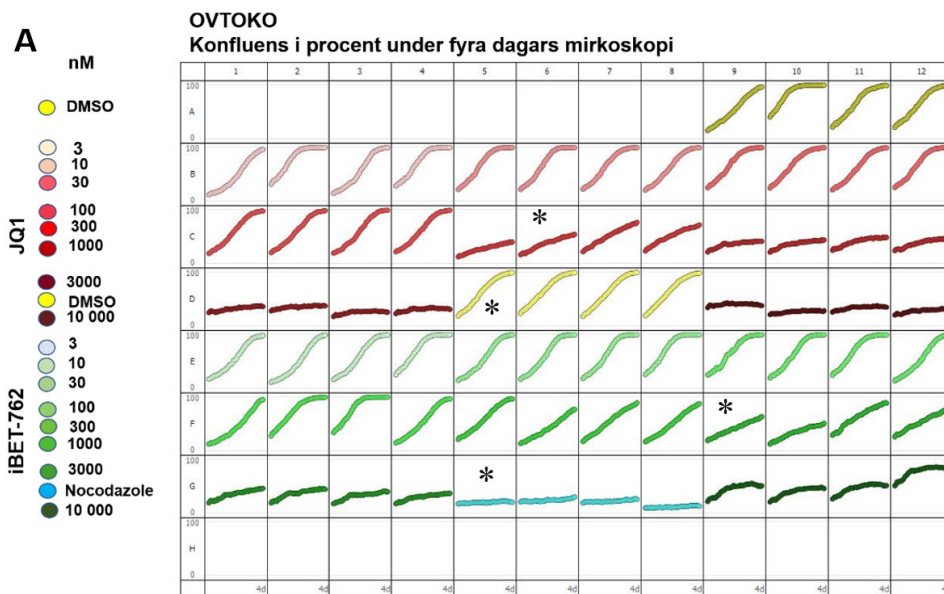


Figur 23. ES-2-cellers känslighet mot JQ1 och iBET-762 på basen av konfluens efter fyra dagars behandlingar med BET-hämmarna. (A) Konfluensgraf med alla koncentrationer av BET-hämmarna samt kontroller som kvadruplikat (horisontalt). Grafen visar konfluensen för varje brunn under fyra dagar. (B, C, D & E) Representativa bilder på ES-2 behandlade med BET-hämmarna JQ1 och iBET-762 och kontrollerna DMSO och Nocodazole. Bilderna visar proliferationen för vartannat dygn under fyra dagar. Asteriskerna i konfluensgraf (A) visar de brunnar därifrån bilderna är tagna.



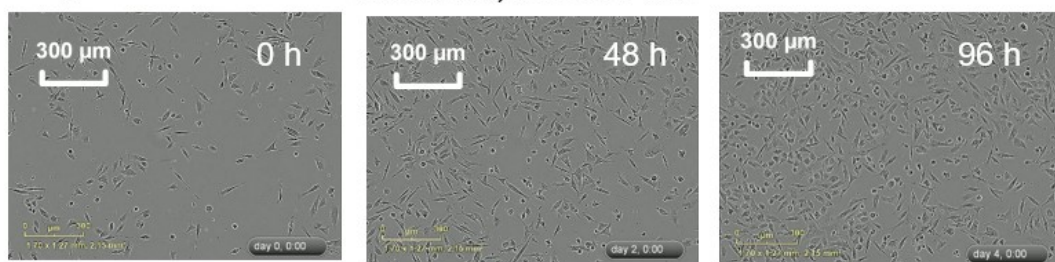


Figur 24. TOV21G-cellers känslighet mot JQ1 och iBET-762 på basen av konfluens efter fyra dagars behandlingar med BET-hämmarna. Konfluensgraf med alla koncentrationer av JQ1 (A) och iBET-762 (B) samt kontroller som kvadruplikat (vertikalt). Grafen visar konfluensen för varje brunn under fyra dagar. (B, C, D & E) Representativa bilder på TOV21G behandlade med BET-hämmarna JQ1 och iBET-762 och kontrollerna DMSO och Nocodazole. Bilderna visar proliferationen för vartannat dygn under fyra dagar. Asteriskerna i konfluensgraf (A) visar de brunnar därifrån bilderna är tagna.



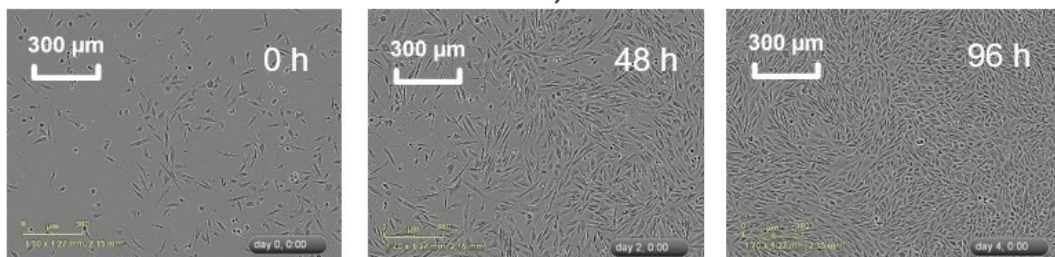
B

OVTOKO, JQ1 300 nM



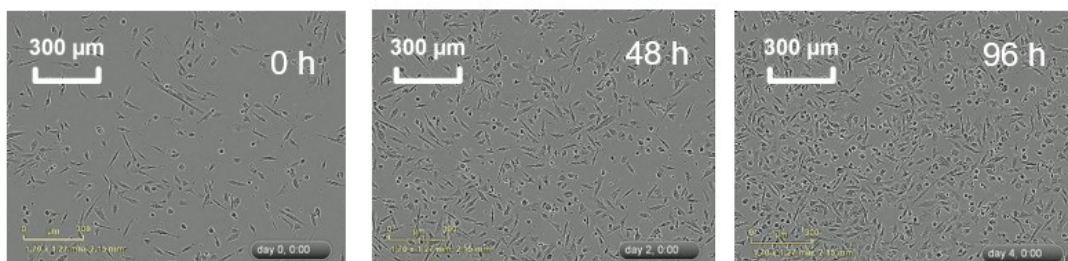
C

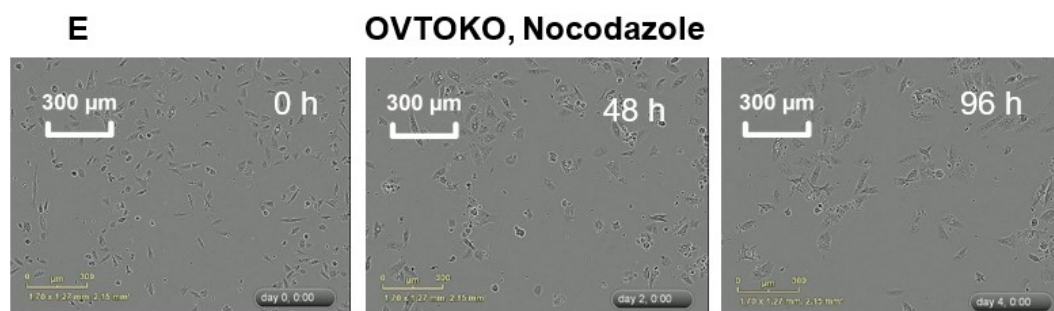
OVTOKO, DMSO



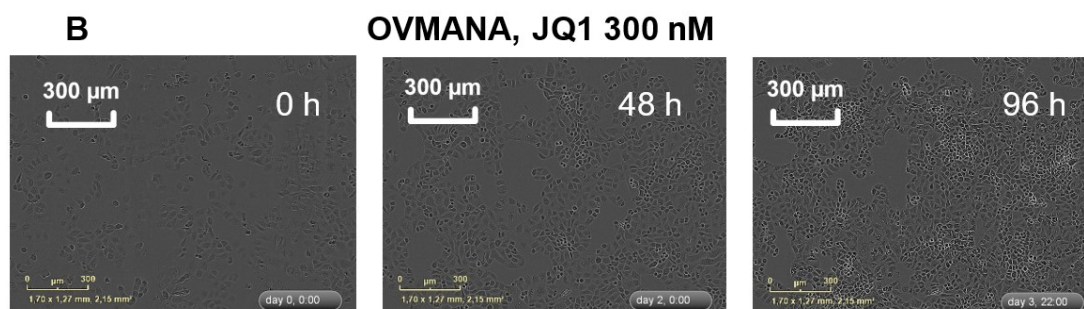
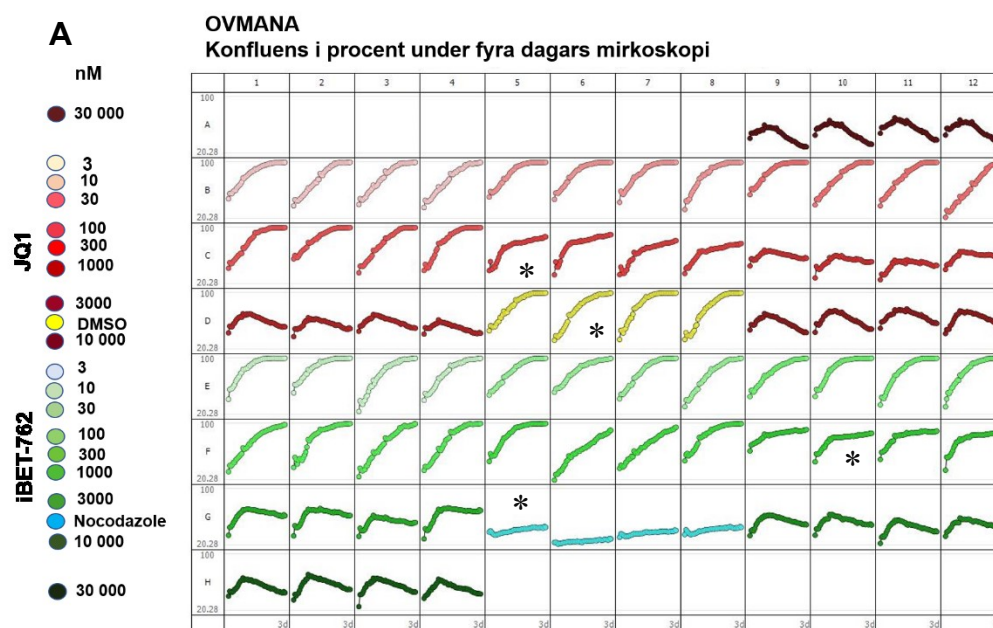
D

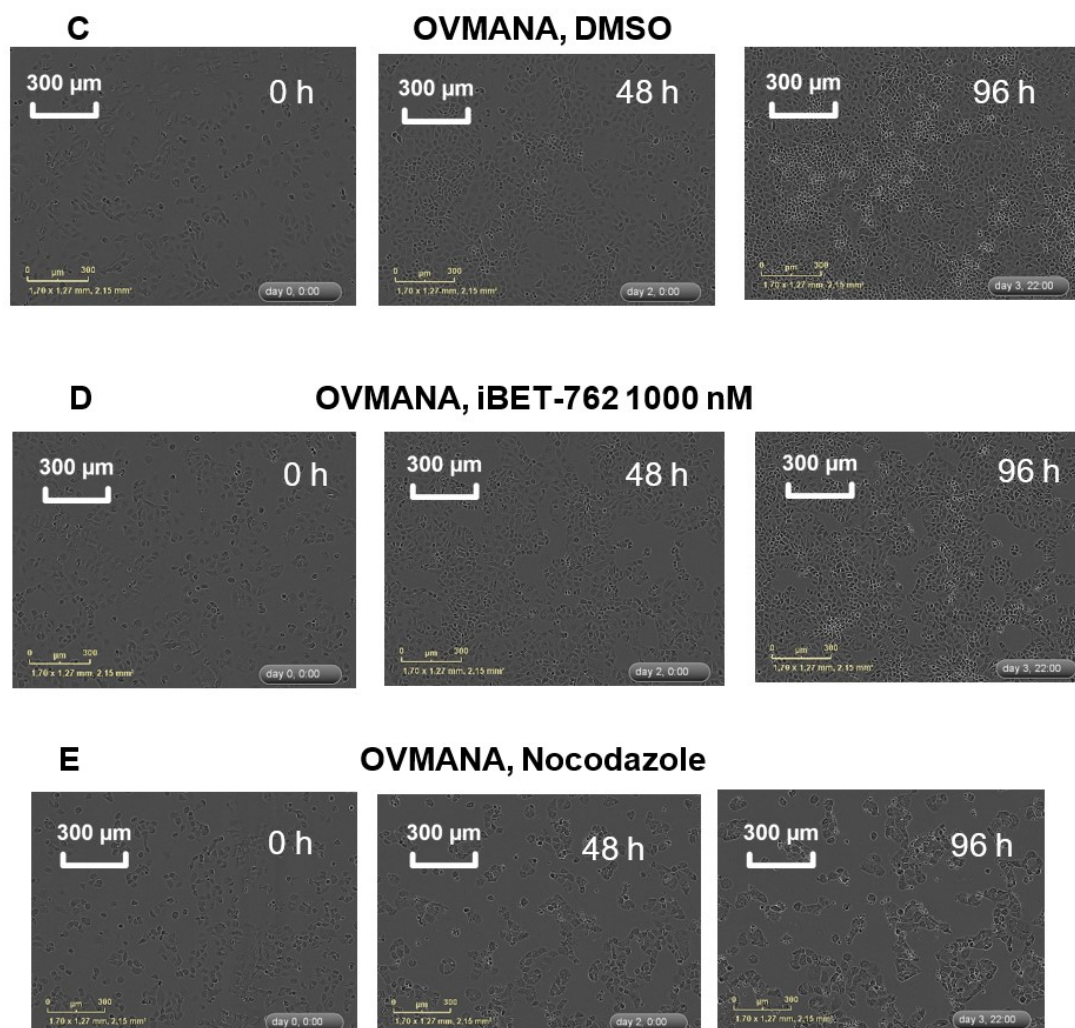
OVTOKO, iBET-762 1000 nM





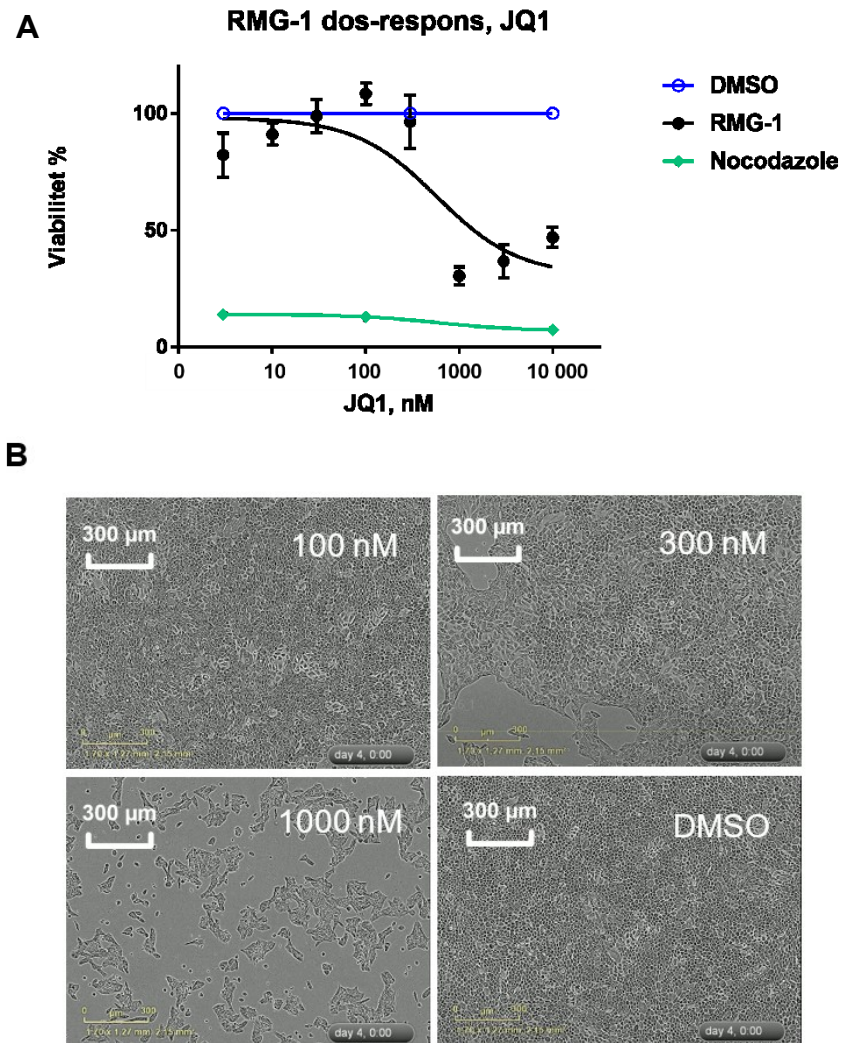
Figur 25. OVTOKO-cellers känslighet mot JQ1 och iBET-762 på basen av konfluens efter fyra dagars behandlingar med BET-hämmarna. (A) Konfluensgraf med alla koncentrationer av BET-hämmarna samt kontroller som kvadruplikat (horisontalt). Grafen visar konfluensen för varje brunn under fyra dagar. (B, C, D & E) Representativa bilder på OVTOKO behandlade med BET-hämmarna JQ1 och iBET-762 och kontrollerna DMSO och Nocodazole. Bilderna visar proliferationen för vartannat dygn under fyra dagar. Asteriskerna i konfluensgrafen (A) visar de brunnar därifrån bilderna är tagna.



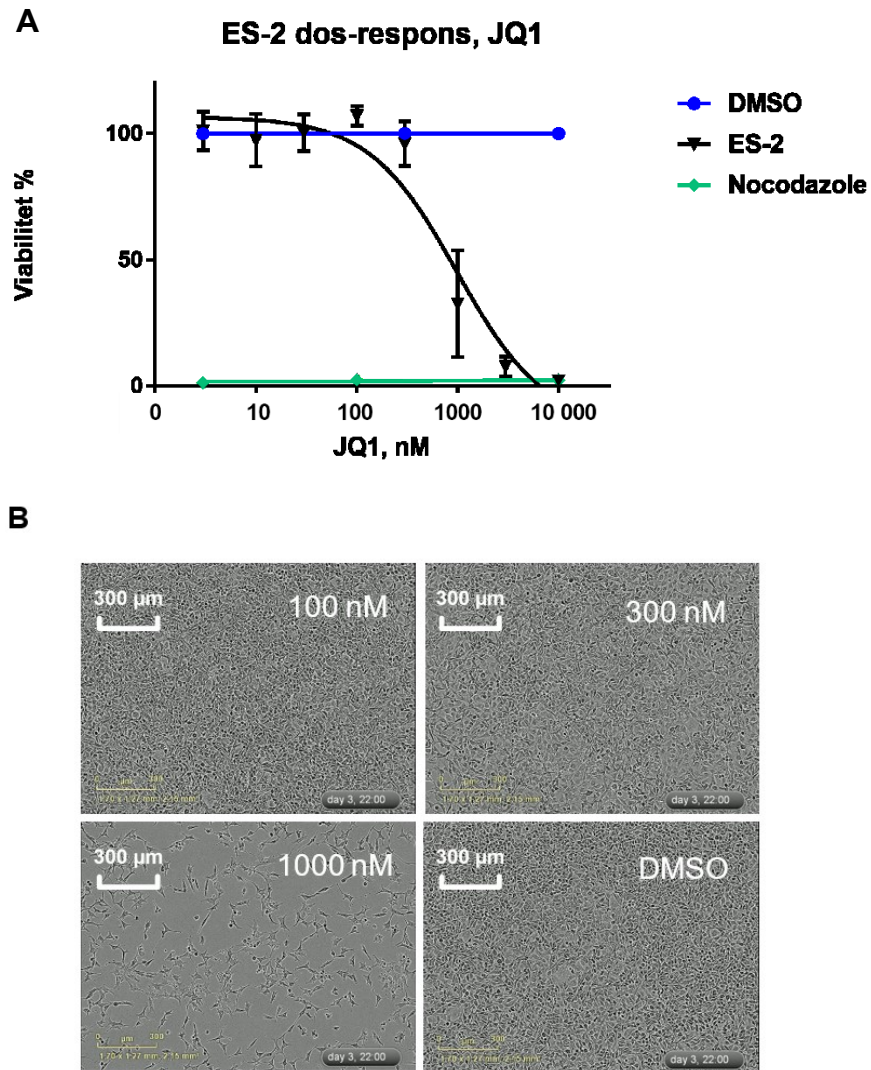


Figur 26. OVMANA-cellers känslighet mot JQ1 och iBET-762 på basen av konfluens efter fyra dagars behandlingar med BET-hämmarna. (A) Konfluensgraf med alla koncentrationer av BET-hämmarna samt kontroller som kvadruplikat (horisontalt). Grafen visar konfluensen för varje brunn under fyra dagar. (B, C, D & E) Representativa bilder på OVTOKO behandlade med BET-hämmarna JQ1 och iBET-762 och kontrollerna DMSO och Nocodazole. Bilderna visar proliferationen för vartannat dygn under fyra dagar. Asteriskerna i konfluensgrafen (A) visar de brunnar därifrån bilderna är tagna.

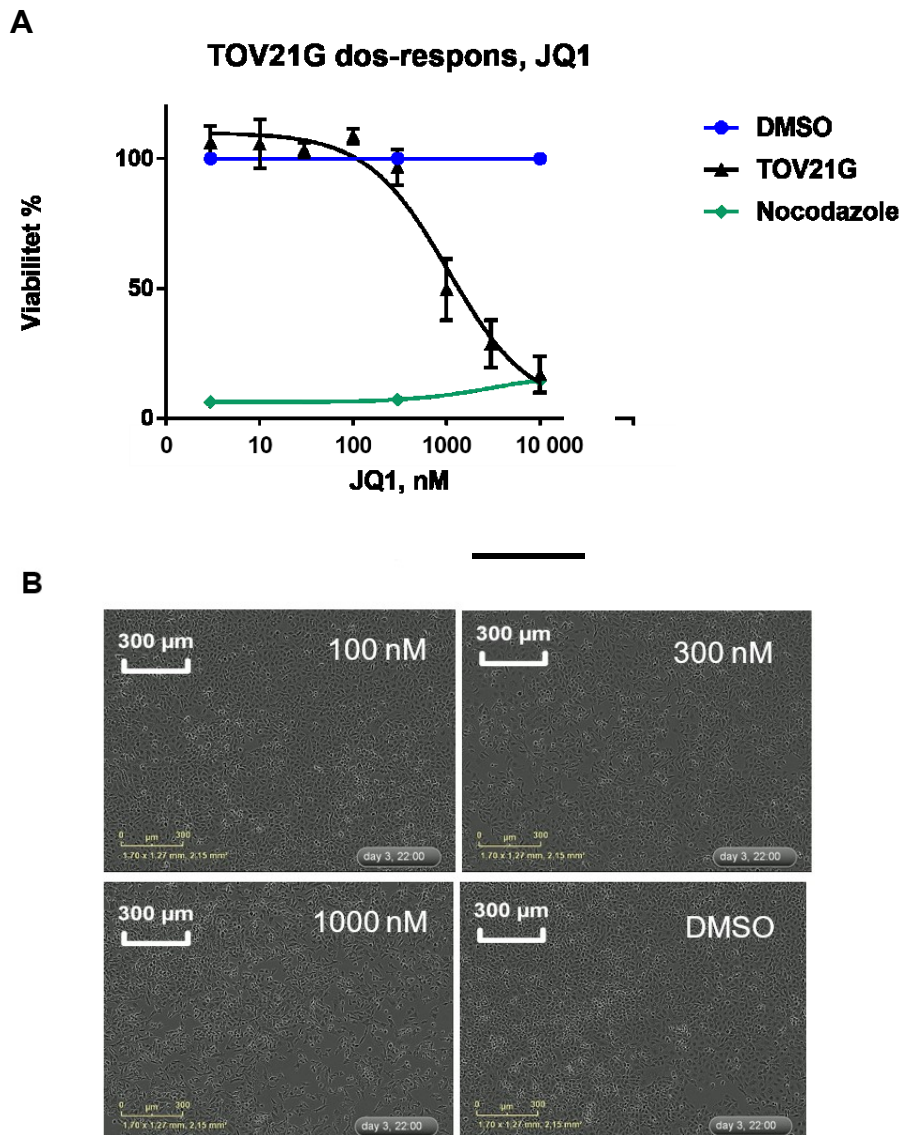
Nedan finns tydliga dos-respons-kurvor för JQ1 enskilt för varje cellinje med utmärkta kontroller, dvs. DMSO och Nocodazole. Nocodazole indikerar den viabilitetsnivån där cellerna varken prolifererar eller dör. Det är denna nivå som eftersträövades med BET-hämning vid OCCC. Nocodazole-behandlingen orsakade ändå en del apoptotiska celler hos varje cellinje (fig. 22-26E), vilket bör beaktas när graferna 19–23A betraktas. Resultaten från behandlingar med iBET-762 är jämförbara med resultaten från behandlingar med JQ1 (fig. 18 & 19). Däremot erhöles hämning med JQ1 vid lägre koncentrationer och därvid visas dessa resultat noggrannare i följande figurer.



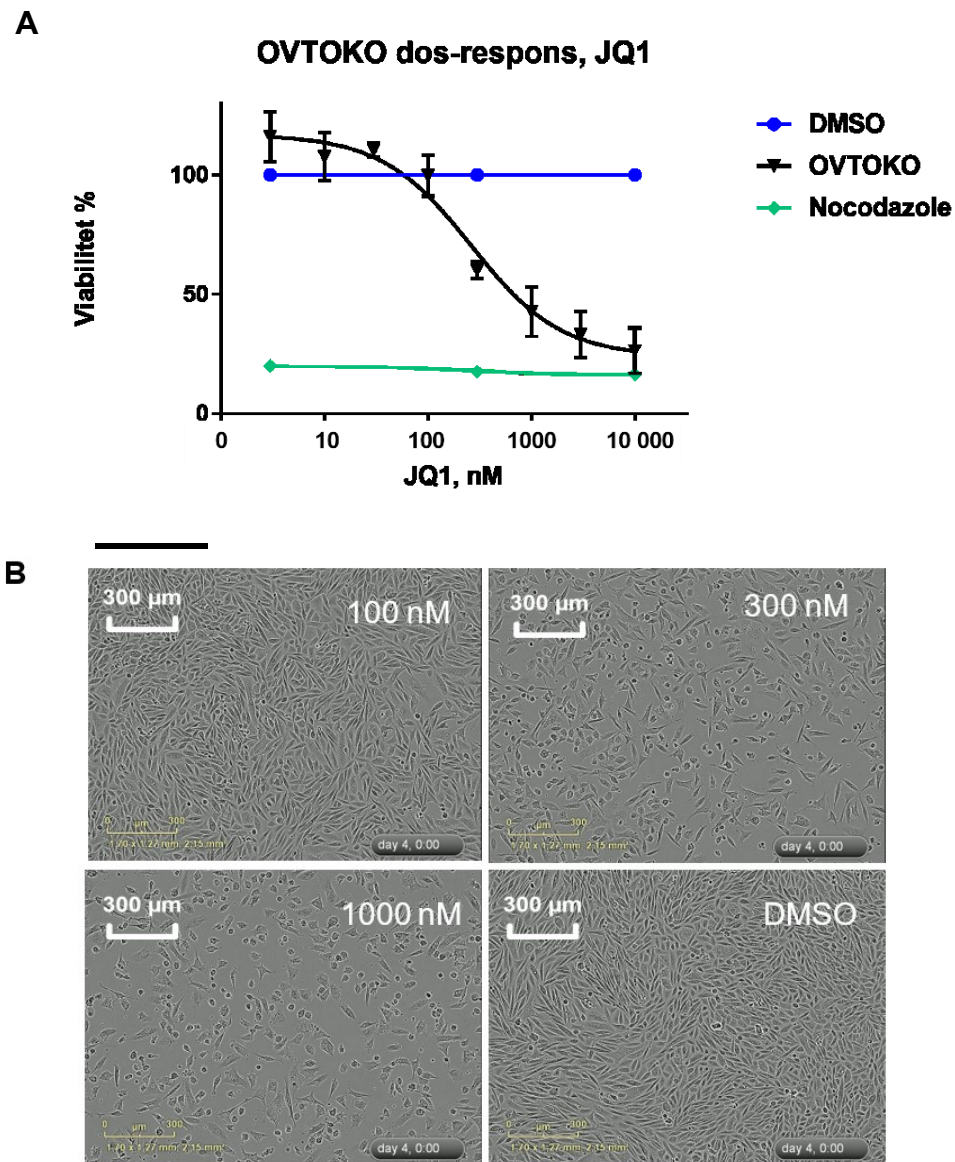
Figur 27. (A) RMG-1 dos-respons för JQ1 med kontrollerna DMSO och Nocodazole utmärkta. (B) Faskontrastmikroskopibilder från RMG-1-undersökning med JQ1 med koncentrationerna 100, 300 och 1000 nM samt DMSO efter 4 dagars behandling.



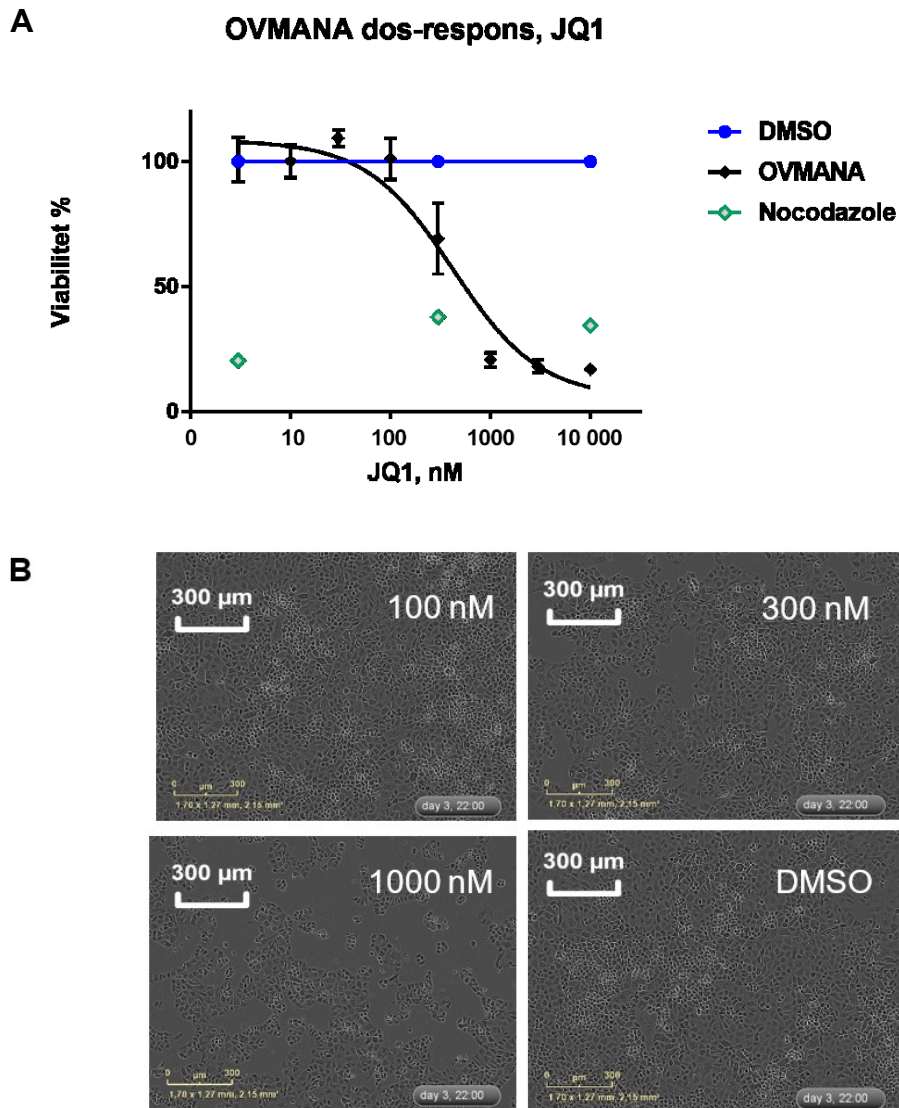
Figur 28. (A) ES-2 dos-respons för JQ1 med kontrollerna DMSO och Nocodazole utmärkta. (B) Faskontrastmikroskopibilder från ES-2-undersökning med JQ1 med koncentrationerna 100, 300 och 1000 nM samt DMSO efter 4 dagars behandling.



Figur 29. (A) TOV21G dos-respons för JQ1 efter fyra dagars behandling med kontrollerna DMSO och Nocodazole utmärkta. (B) Faskontrastmikroskopibilder från TOV21G-undersökning med JQ1 med koncentrationerna 100, 300 och 1000 nM samt DMSO efter 4 dagars behandling.



Figur 30. (A) OVTOKO dos-respons för JQ1 efter fyra dagars behandling med kontrollerna DMSO och Nocodazole utmärkta. (B) Faskontrastmikroskopibilder från OVTOKO-undersökning med JQ1 med koncentrationerna 100, 300 och 1000 nM samt DMSO efter 4 dagars behandling.

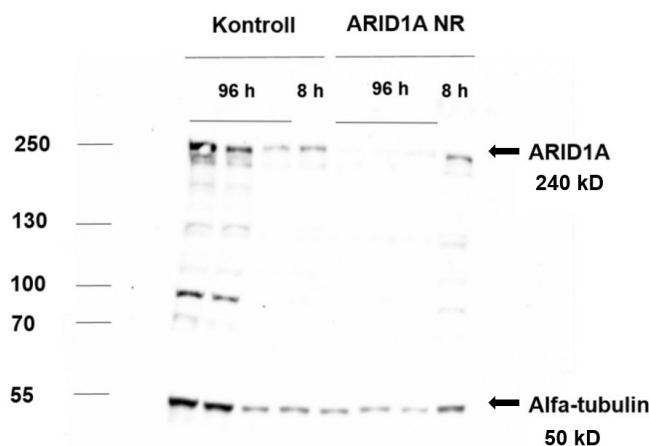


Figur 31. (A) OVMANA dos-respons för JQ1 efter fyra dagars behandling med kontrollerna DMSO och Nocodazole utmärkta. (B) Faskontrastmikroskopibilder från OVMANA-undersökning med JQ1 med koncentrationerna 100, 300 och 1000 nM samt DMSO efter 4 dagars behandling.

5.4 Nedreglering av ARID1A hos vildtypscellinjen ES-2

För att försäkra resultaten från tidigare dos-respons-experiment där vildtypscellinjer jämfördes med *ARID1A*-muterade cellinjer, utfördes samma experiment med nedreglerat *ARID1A* hos vildtypscellinjen ES-2. *ARID1A* nedreglerades genom att transfektera ES-2 celler med siRNA, som specifikt binder till *ARID1A*-mRNA. Som

transfektionskontroll användes ospecifikt siRNA. Transfektionen utfördes med Lipofectamine®-reagenset under åtta timmars inkubering. Figur 32 visar att transfektionen lyckats.

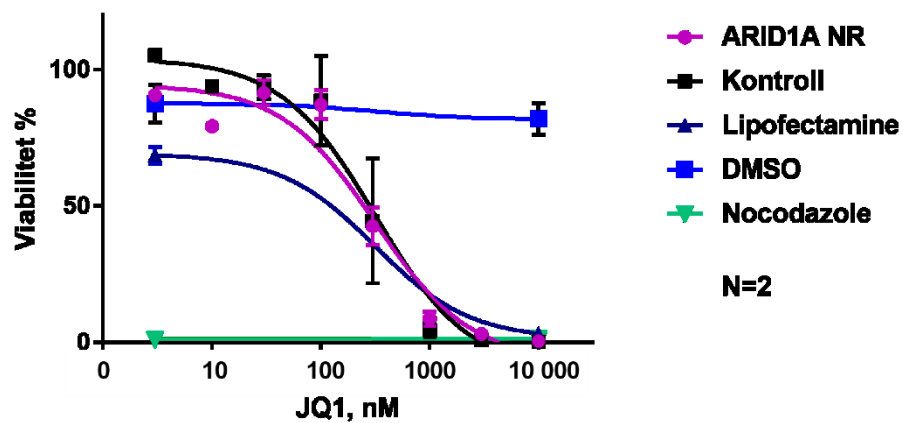


Figur 32. Western blott efter transfektion strax före cellerna plattades i 96-brunnsplatta (8 h) och efter dos-respons-experimentet (96 h). De fyra första brunnarna visar transfektionskontrollen som nedreglering av *ARID1A* (ARID1A NR) jämförs med. Alfa-tubulin användes som laddningskontroll.

Dos-respons-kurvorna för JQ1 och iBET-762 hos ES-2-cellerna både för nedreglerat *ARID1A* (ARID1A NR) och transfektionskontrollen (Kontroll) finns till åskådande i figur 33. Kurvorna för både JQ1 och iBET-762 ser likadana ut. Även de beräknade IC50-värdena ligger väldigt nära varandra: värdet för JQ1 hos ARID1A NR är 360 nM medan värdet för kontrollen är 290 nM. Värdena är motsvarande för iBET-762, nämligen 860 nM respektive 810 nM. Transfektionsexperimenten lyckades inte problemfritt, då Lipofectamine® var onödigt toxiskt för cellerna i ett av experimenten (fig. 33–35). Dessutom varade transfektionen inte riktigt 96 h (fig. 32). Därför kräver dessa experiment ytterligare undersökning.

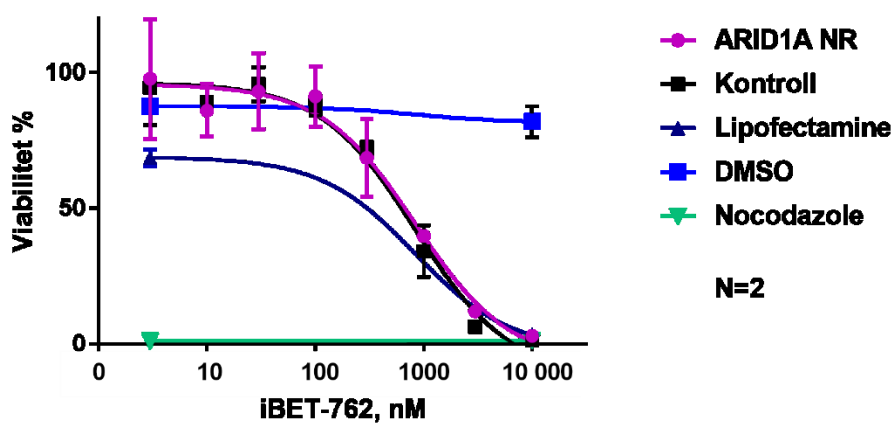
A

ES-2 dos-respons: ARID1A NR jämfört med kontroll

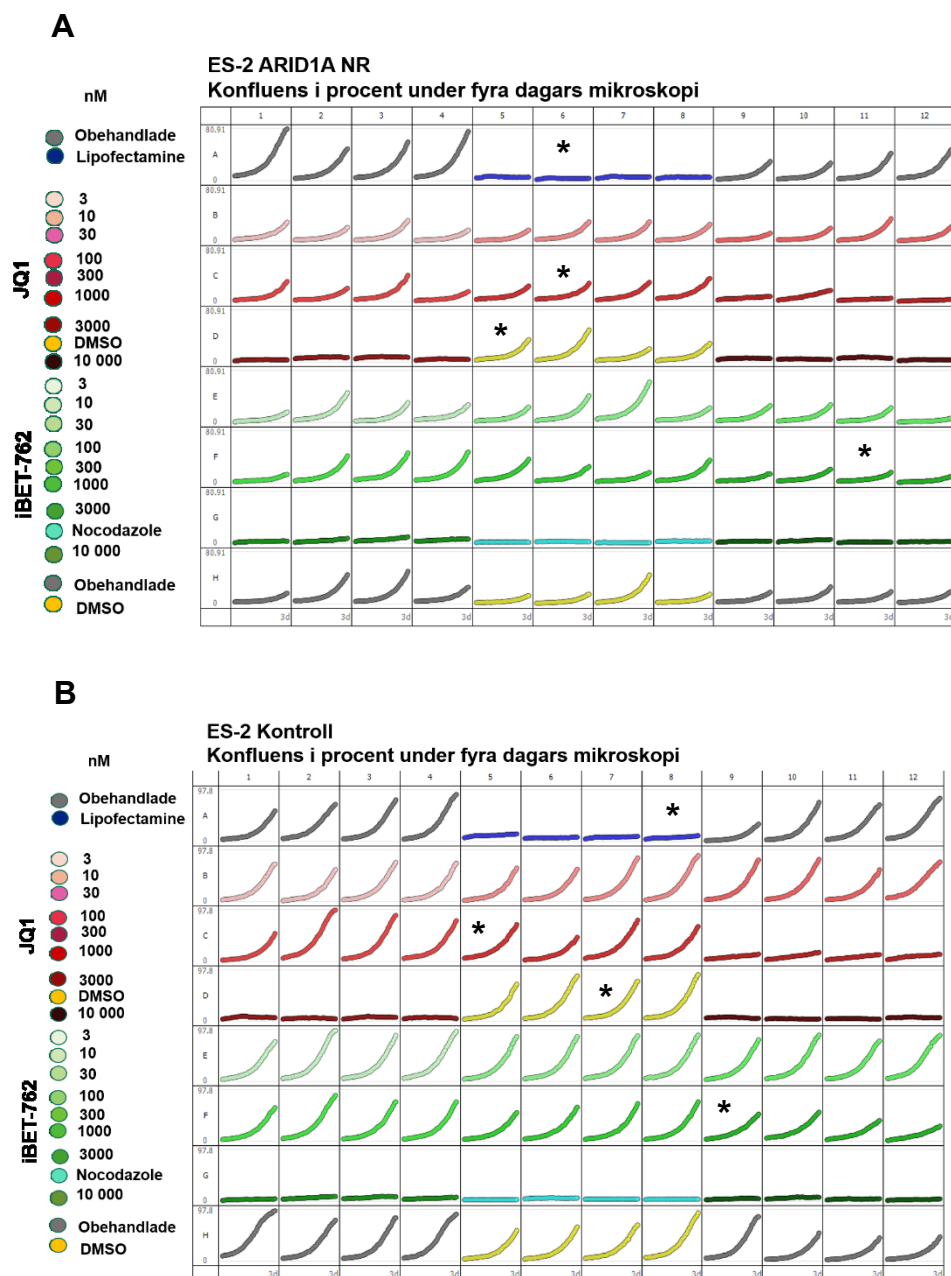


B

ES-2 dos-respons: ARID1A NR jämfört med kontroll



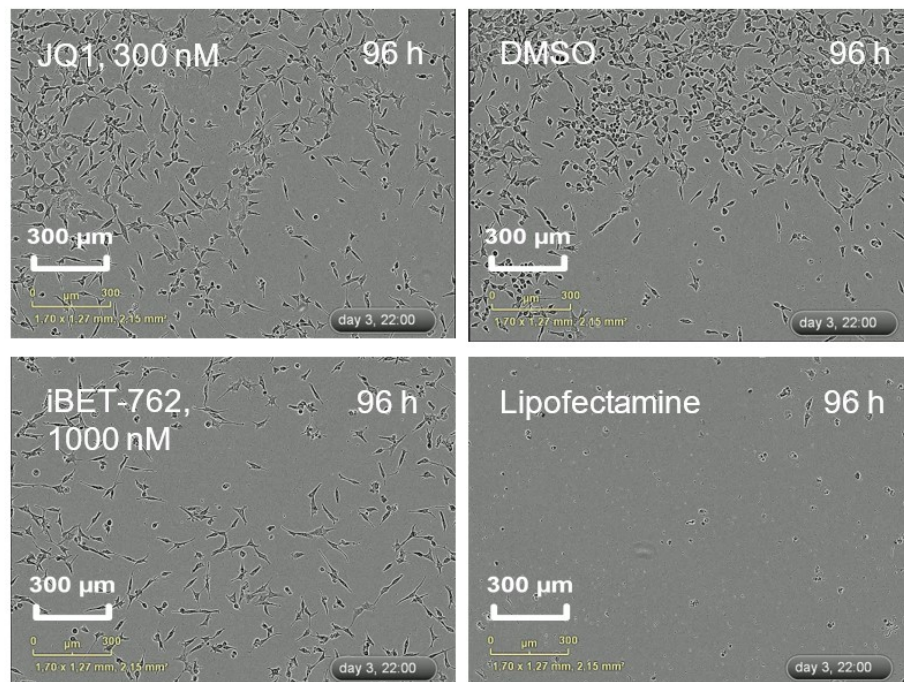
Figur 33. Dos-respons-kurvor för (A) JQ1 och (B) iBET-762 med ARID1A NR jämfört med transfektionskontrollen. Kontrollerna Lipofectamine®, DMSO och nocodazole är även presenterade. Datat har erhållits efter 96 h med MTT-metoden och normaliserats mot obehandlade celler.



Figur 34. Konfluensgrafer från Incucyte Zoom för (A) ARID1A NR och (B) Kontroll under fyra dagar. Asteriskerna visar de brunnar därifrån bilderna i figur 35 är tagna.

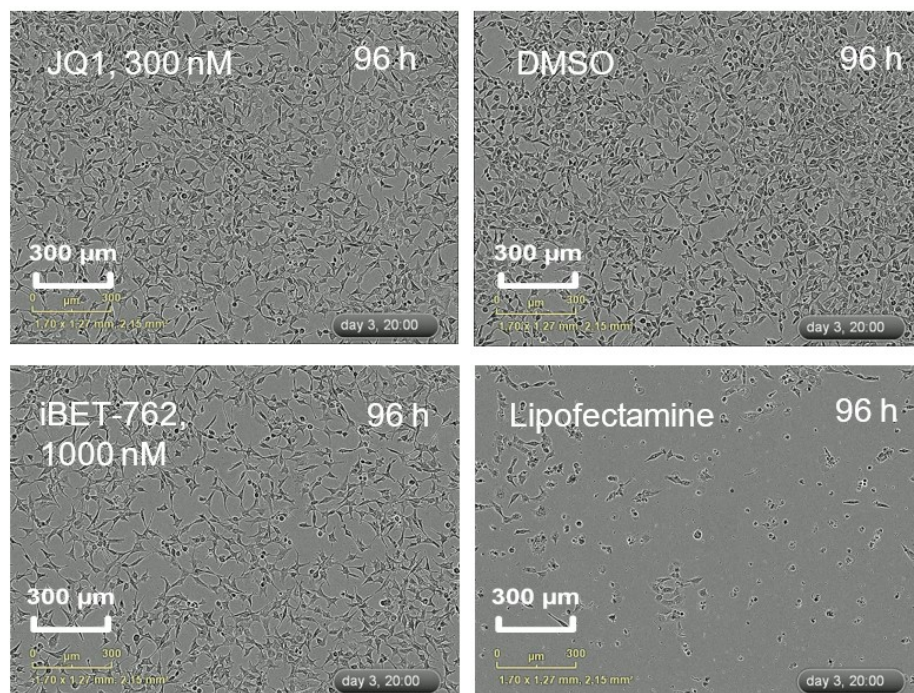
A

ES-2, ARID1A NR



B

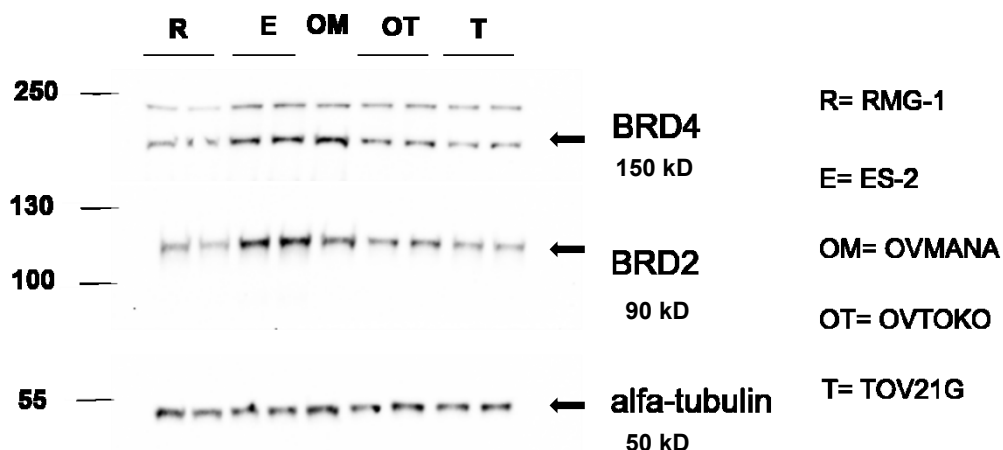
ES-2, Kontroll



Figur 35. Bilder från Incucyte Zoom för (A) ARID1A NR och (B) Kontroll efter fyra dagar (96 h). Asteriskerna i konfluensgraferna i figur 34 visar de brunnar därifrån bilderna är tagna.

5.5 BRD2 och BRD4 ger ingen antydan om känslighet för BET-hämmare

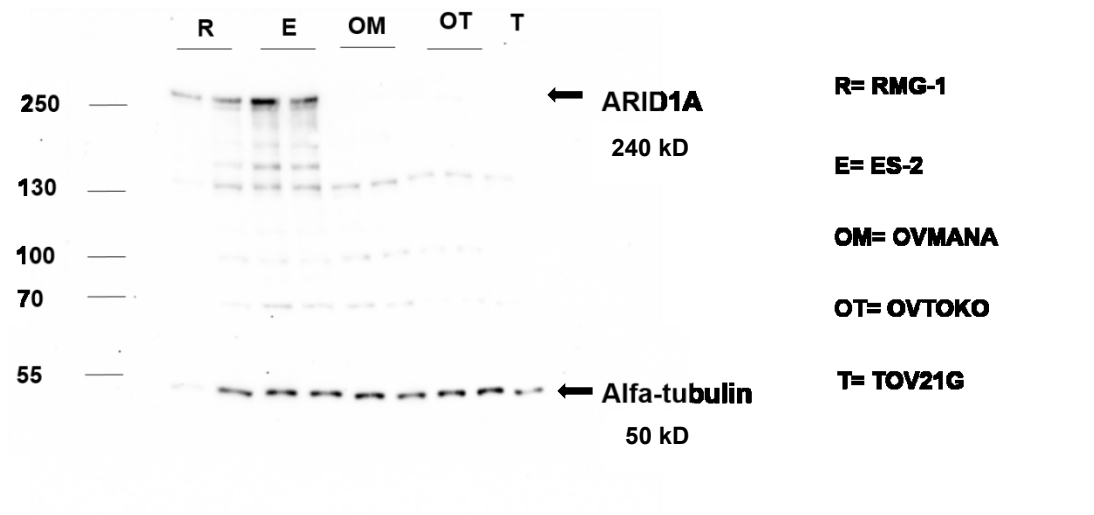
För att hitta vilket BET-protein som styr BET-hämmarnas verkan utfördes western blott. Proteinnivåerna för både BRD2 och BRD4 var signifikant högre hos ES-2 jämfört med andra cellinjer, förutom hos OVMANA som hade ungefär lika mycket BRD4 som ES-2 (fig. 36). Eftersom OVTOKO och OVMANA är känsligast mot BET-hämmarna på basen av dos-respons-experimenten, ger dessa resultat ingen antydan om BRD4 som ledande part i *ARID1A*-muterade cellers hämning. Det går inte heller att peka ut BRD2 som den ledande parten i hämningen, eftersom ES-2 är den enda cellinjen som visar en signifikant högre proteinnivå av BRD2 men den är inte den enda som visar högre resistans mot BET-hämning jämfört med OVTOKO och OVMANA.



Figur 36. Western blott på BRD2 och BRD4 hos varje cellinje. Som laddningskontroll användes alfa-tubulin. Alla förutom OVMANA blottades som duplikat; inga replikat med OVMANA blottades i denna blott.

5.6 ARID1A finns i högre mån i ES-2 än RMG-1

ARID1A blottades för alla cellinjer för att upptäcka skillnader i proteinnivån hos vildtypscellinjerna RMG-1 och ES-2 samt för att kontrollera att ARID1A inte finns närvarande i de muterade cellinjerna OVMANA, OVTOKO och TOV21G. ARID1A-proteinnivån hos ES-2 ser ut att vara ungefär dubbelt högre än hos RMG-1 (fig. 37). Inget ARID1A upptäcktes hos de muterade cellinjerna (fig. 37).



Figur 37. Western blott på ARID1A hos varje cellinje. Som laddningskontroll användes alfa-tubulin. Alla förutom TOV21G blottades som duplikat; inga replikat med TOV21G blottades i denna blott.

6. Diskussion

Syftet med detta arbete var att ta reda på ifall BET-hämmare påverkar *ARID1A*-muterade OCCC-celler specifikt när dessa jämförs med vildtyps-OCCC-celler. *ARID1A*-mutationer förekommer i så många som 50 % av OCCC-fall. Mutationerna orsakar oftast att ett inaktivt protein transkriberas (Jones et al., 2010; Wiegand et al., 2010). *ARID1A* ingår som en komponent i det ATP-beroende nukleosomremodelleringskomplexet SWI/SNF, där den tros bidra till specificitet (Jones et al., 2010; Nagl et al., 2007; Wilsker et al., 2004). Nedreglering av proteinet har visats påverka uttrycket av hundra gener bland annat genom inverkan på histonacetylering vid promotorer och förstärkande gensekvenser (Lakshminarasimhan et al., 2017). BET-hämmare hämmar BET-proteinerna BRD2, BRD3 och BRD4 (Filippakopoulos et al., 2010; Nicodeme et al., 2010). Dessa proteiner är viktiga läsare av en histonkod, dvs. av olika kombinationer av histonmodifieringar, och binder specifikt till acetylerade histoner varvid de rekryterar transkriptionsreglerare (Dey et al., 2003; Kanno et al., 2004; LeRoy et al., 2008; Loyola & Almouzni, 2004). BRD4 har upptäckts binda i hög grad vid super-förstärkande gensekvenser. I många studier med BET-hämmare är det BRD4 som bidrar till den terapeutiska effekten (Shi & Vakoc, 2014). Hursomhelst, är även BRD2 ett mycket potentiellt målprotein för hämning hos *ARID1A*-muterad cancer: BRD2 har nämligen visats binda till SWI/SNF-komplex där *ARID1A* ingår (Denis et al., 2006). Dessutom har nedreglering av BRD2 hos *ARID1A*-muterade OCCC-celler visats åstadkomma liknande verkan som BET-hämmaren JQ1 (Berns et al., 2018). Däremot är BRD3:s funktioner inte lika välkända men den bäst kända funktionen är proteinets associering med transkriptionsfaktorn GATA1 (Gamsjaeger et al., 2011; Lamonica et al., 2011). BET-proteinerna har även visats ha samma funktioner i vissa fall, t.ex. associerar BRD2, BRD3 och BRD4 med enzymerna JMJD6 och GLTSCR1 (Rahman et al., 2011). Dessa enzymer har även visats associera med SWI/SNF-komplex (Miller et al., 2010; Middeljans, 2012). BET-proteinerna verkar även reglera varandra: vid nedreglering av BRD2 minskar uttrycket av BRD4 medan uttrycket av BRD3 ökar (Hnilicová et al., 2013). Detta bör beaktas ifall endast ett av dessa proteiner hämmas. Detta kan även vara orsaken till att nedreglering av BRD2 åstadkom liknande verkan som JQ1 i studien av Berns et al. (2018). Ty, det andra syftet med detta arbete var att utpeka vilket av dessa tre proteiner som utträttar den terapeutiska effekten.

För det första syftet där BET-hämningens verkan jämfördes mellan *ARID1A*-muterade cellinjer (TOV21G, OVTOKO och OVMANA) och vildtypscellinjer (RMG-1 och ES-2) utfördes dos-respons med olika koncentrationer av BET-hämmarna JQ1 och iBET-762, nämligen med 3, 10, 30, 100, 300, 1 000, 3 000 och 10 000 nM. Cellerna behandlades som kvadruplikat i 96-brunnsplattor, varefter deras proliferation uppföljdes under fyra dagar i faskontrastmikroskopsystemet Incucyte Zoom. Efter fyra dagars behandling utfördes viabilitetsmetoden WST-1 eller MTT, vilka ger ett linjärt samband på antalet levande celler i varje brunn. Från insamlade data på viabilitet gjordes dos-respons-kurvor och bestämning av IC50-värden för varje cellinje. För att kunna försäkra hypotesens giltighet gjordes även samma dos-respons-experiment på vildtypscellinjen ES-2 där *ARID1A* nedreglerats med siRNA. Resultaten från dessa experiment är bristfälliga på grund av några misslyckade försök att nedreglera *ARID1A* och Lipofectamine®-reagensets toxicitet. För det andra syftet att undersöka vilket BET-protein som är ansvarigt för BET-hämningens verkan, utfördes western blott på BRD2 och BRD4. Resultaten från alla experiment diskuteras härnäst.

6.1 Jämförelse av viabilitetsmetoderna MTT och WST-1

Inga drastiska skillnader mellan viabilitetsmetoderna MTT och WST-1 märktes hos ES-2 (fig. 16) trots att de beräknade IC50-värdena skiljer sig betydligt. Däremot fungerade WST-1 inte alls på OVTOKO (fig. 17). Det är möjligt att reagenset bara blivit gammalt i det skede WST-1 provades på denna cellinje. Dock finns det en stor skillnad mellan hur MTT och WST-1 fungerar: MTT tas åtminstone delvis in av cellen och dess tetrazoliumsalt reduceras därvid i bl.a. mitokondrier, medan WST-1:s tetrazoliumsalt reduceras extracellulärt vid cellmembranet (Berridge et al., 2005). För att WST-1-saltet ska reduceras, verkar cell-cellkontakt vara väsentligt i alla fall hos immunceller (Koyanagi, Kawakabe, & Arimura, 2016). Koyanagi et al. (2016) jämförde bl.a. metoderna MTT och WST-1 med upptäckten att WST-1 inte reducerats i en jämn takt när cellantalet ökade. Däremot ökade absorbansen för MTT redan med en liten ökning i cellantal. När cellantalet ökat signifikant sköt absorbansen för WST-1 i höjden, vilket tyder på att cell-cellkontakt krävs för extracellulär reduktion vid cellmembranet (Koyanagi et al., 2016). Detta kan även vara en orsak till att WST-1 inte fungerade för OVTOKO, eftersom dessa celler är fibroblast-lika och växer därför

enskilt tills de uppvisar konfluens (fig. 25). Även ES-2 är fibroblast-lik (fig. 23) men dessa celler var inte så känsliga mot BET-hämning, vilket resulterade i att de växte nästan till konfluens även under BET-hämning (fig. 23). De andra cellinjerna RMG-1, TOV21G och OVMANA är epitel-lik och växer därvid som kolonier även vid små cellantal (fig. 22, 24 & 26). Därför torde WST-1 fungera på dessa cellinjer, vilket kunde påvisas med RMG-1 och OVMANA (fig. 22 & 26). Hursomhelst visade WST-1 knappt någon absorbans förrän ett lämpligt cellantal nåtts i studien av Koyanagi et al. (2016), vilket är motsatsen till det resultat WST-1 uppvisar för OVTOKO (fig. 17). WST-1 för OVTOKO visade på viabilitet runt 80 % vid alla koncentrationer av BET-hämmarna, därvid är det mycket möjligt att reagenset endast varit gammalt vid det skede när WST-1 gjorts på OVTOKO.

6.2 Dos-respons-experiment

6.2.1 *ARID1A*-mutation förutbestämmer inte känsligheten för BET-hämmare i OCCC

Dos-respons-experiment för BET-hämmarna JQ1 och iBET-762 utfördes för att jämföra känsligheten av de *ARID1A*-muterade cellinjerna TOV21G, OVMANA och OVTOKO med vildtypscellinjerna RMG-1 och ES-2. OVMANA och OVTOKO visade vara betydligt känsligare för BET-hämning än de andra cellinjerna, därvid kan inte den slutsatsen dras att enbart *ARID1A*-mutation förutbestämmer en bättre respons mot BET-hämning. Medan detta arbete pågick, publicerade Berns et al. (2018) en liknande undersökning där de också upptäckte bättre känslighet mot JQ1 hos OVMANA och OVTOKO jämfört med TOV21G, ES-2 och andra *ARID1A*-muterade cellinjer och vildtypscellinjer. Däremot upptäckte de även bra respons hos RMG-1. De hade undersökt fler cellinjer än vad jag har i detta arbete gjort: av fem vildtypscellinjer visade endast RMG-1 bra respons mot JQ1, medan sju av nio *ARID1A*-muterade cellinjer var känsliga mot hämningen (Berns et al., 2018). Berns et al. visade också att IC50-värdet för JQ1 hos de känsliga cellinjerna ligger runt 250 nM, motsvarande värden som detta arbete redovisar för: IC50-värdet hos OVTOKO är beräknat 260 nM och 390 nM hos OVMANA (tabell 7). Dessutom beräknades ett lågt värde även för RMG-1 på 570 nM men vid åskådande av kurvan är detta värde inte tillförlitligt på grund av många uteliggare och en rätt så plan kurva (fig. 22). Hursomhelst syns en bra respons hos RMG-1 mot 300 nM av JQ1 vid iakttagande av bilderna från Incucyte

Zoom (fig. 22). Däremot när konfluensen under fyra dagar jämfördes mellan cellinjerna visade endast OVTOKO och OVMANA en lägre proliferationshastighet vid 300 nM av JQ1, men detta kunde inte visas signifikant med multipla t-tester med data från den fjärde dagen (fig. 21). De mer resistenta cellinjerna ES-2 och TOV21G visar ingen respons ännu vid denna koncentration (fig. 23 & 24). TOV21G verkar dessutom vara rätt så resistent ännu för JQ1 med koncentrationen 1000 nM (fig. 24), vilket stämmer överens med dos-respons-kurvorna och de beräknade IC50-värdena, där denna cellinje trots dess muterade status visar det högsta värdet på 1100 nM. Datat från iBET-762 visar liknande resultat där viabiliteten för OVTOKO och OVMANA är signifikant lägre vid 1000 nM än för de andra cellinjerna (fig. 19). Däremot påvisades inga signifikanta skillnader för konfluens (fig. 21).

Tabell 7. Rangordning och jämförelse av beräknade IC50-värden för JQ1 i detta arbete och studien av Berns et al. (2018). Cellinjerna har rangordnats med början av de mest känsliga cellinjerna. Märkväl att Berns et al. inte har beräknat exakta IC50-värden i deras studie

| Cellinje | Mutationsstatus | Denna avhandling | Berns et al. |
|----------|-------------------------|------------------|----------------|
| | | IC50: JQ1 (nM) | IC50: JQ1 (nM) |
| OVTOKO | <i>ARID1A</i> -mutation | 260 | 250 |
| OVMANA | <i>ARID1A</i> -mutation | 390 | 250 |
| RMG-1 | Vildtyp | 570 | 250 |
| ES-2 | Vildtyp | 980 | >500 |
| TOV21G | <i>ARID1A</i> -mutation | 1100 | >250 |

Det är värt att notera att Berns et al. har använt ett mindre antal koncentrationer av JQ1, nämligen endast 125 nM, 250 nM och 500 nM, därvid har inte IC50-värdena beräknats lika utförligt som i detta arbete. För beräkningen använde de multipla t-tester med Fishers exakta test för att visa signifikans mot DMSO. För betämning av cellers viabilitet, använde de sig av en kolonibildningsmetod, crystal violet, som liksom MTT är en mycket använd metod för detta ändamål. Fördelen med crystal violet är att den inte är en enzymatisk metod, istället baserar den sig på färgämnets affinitet till DNA: metoden mäter levande, vidhäftade celler på basen av mängden DNA. Därvid utesluter crystal violet läkemedels eventuella påverkan på cellers metabolism, som kan

förvränga resultat om en enzymatisk viabilitetsmetod används, såsom MTT och WST-1 (Śliwka et al., 2016). Det är därför rekommendabelt att använda olika metoder för att säkerställa sanna resultat. I detta arbete har cellernas proliferation undersökts i Incucyte Zoom och resultaten korrelerar bra med cellernas viabilitet mätt med MTT och WST-1 (fig. 18 & 20). Studien av Berns et al. bekräftar också dessa resultat (tabell 7).

6.2.2 RMG-1 uppvisar tydliga morfologiska förändringar under BET-hämning

RMG-1 har en epitel-lik morfologi. De bildar täta kolonier redan efter celldelning, varefter de börjar växa och dela sig tills kolonierna växer samman (fig. 22). Hos dessa celler syns en morfologisk förändring orsakad av BET-hämning tydligt när kolonierna iaktas: cellerna migrerar lika bra som tidigare men verkar ha svårt att bilda och bibehålla starka cell-cellvidhäftningar vilket resulterar i kantigare och mer spröda kolonier. Detta syns bäst vid höga koncentrationer, såsom vid 1000 nM av JQ1 och iBET-762, där cellerna till en början visar den sedvanliga morfologin men börjar skiljas från varandra efter ca 24 h (fig. 22D & 27B, en del data visas inte). OVMANA har också en epitel-lik morfologi men de ser ut att migrera mindre än RMG-1 och cellstorleken är större. Dessutom verkar de kunna bibehålla cell-cellvidhäftningar bättre än RMG-1 vid ökande BET-hämning, eftersom vid exempelvis 1000 nM av JQ1 hålls deras kolonier rätt så intakt och endast celldelningen ser ut att påverkas av hämningen (fig. 31B). Gällande OVMANA:s morfologi är det värt att notera att dessa celler växer som stora celler till en början men i och med en växande koloni, blir de mittersta cellerna betydligt mindre (fig. 26). Ty, konfluensen hos dessa celler ger en rätt så ofördelaktig uppskattning på cellantalet och proliferationen, därvid är viabiliteten en bättre parameter för bestämning av dos-respons och vid jämförande av de olika cellinjernas känslighet mot BET-hämmare. Det är även värt att notera att OVMANA-celler sträcker ut sig en del under nocodazole-behandling, vilket leder till att Incucyte Zoom beräknar detta som en ökning i konfluens trots att ungefär samma cellantal bibehålls under fyra dagar (fig. 26E). Det är ändå förundransvärt att WST-1-metoden visar på en större viabilitet hos nocodazole-behandlade celler än hos celler behandlade med 1000 nM av JQ1 hos OVMANA (fig. 18) trots en uppenbar skillnad i antalet välmående celler: vissa nocodazole-behandlade celler undergår apoptos

medan JQ1-behandlade celler endast slutar att proliferera (fig. 26E & 31B). Därför fungerade nocodazole inte som en ändamålsenlig kontroll hos OVMANA för den nivå av konfluens och viabilitet där cellerna slutat att dela sig. Trots att RMG-1:s viabilitet också har mätts med WST-1 märktes inte liknande skillnader mellan nocodazole och behandlingar med BET-hämmare hos den cellinjen (fig. 18 & 19). Den tredje epitel-lik cellinjen är TOV21G men dessa celler ser kantigare ut än OVMANA och RMG-1. De bildar inte heller kolonier i samma mån när cellantalet är litet (fig. 24). Inga uppenbara morfologiska skillnader upptäcktes hos denna cellinje vid BET-hämning (fig. 24 & 29), vilket kan förklaras med den högre resistensen mot hämningen jämfört med RMG-1 och OVMANA (fig. 18 & 19).

ES-2 och OVTOKO har en fibroblast-lik morfologi, vilket betyder att cellerna växer enskilt och har en utdragen form (fig. 23 & 25). Hos ES-2 märks inga morfologiska förändringar vid BET-hämning men en del celler undergår apoptos vid 1000 nM av JQ1, vid denna koncentration upphör även proliferationen hos alla cellinjer (endast ändpunktsdata visas, fig. 27–31). Hos OVTOKO syns däremot tydlig påverkan redan från 300 nM av JQ1: ungefär en tredjedel av cellerna sprider ut sig, en tredjedel visar ingen morfologisk förändring och den sista tredjedelen undergår apoptos (fig. 25). Dessa förändringar och OVTOKO:s beräknade konfluens vid denna koncentration stämmer bra överens med det beräknade IC₅₀-värdet på 250 nM för JQ1 (fig. 18, 20 & 25). Således är OVTOKO uppenbart den mest känsliga cellinjen mot BET-hämning.

6.2.3 Nedreglering av ARID1A hos vildtypscellinjen ES-2

Nedregleringen av ARID1A lyckades för endast en del av de utförda transfektionsexperimenten; data visat för de experiment där transfektionen fungerat (N=2). På grund av detta erhöles data från Incucyte Zoom för endast ett experiment (fig. 34 & 35). Lipofectamine®-kontrollen för detta experiment är inte att lita på eftersom inget mediumbyte gjordes efter åtta timmars behandling med reagenset, därvid växte cellerna i Lipofectamine®–OptiMem-mediumet under fyra dagar. Därför är viabiliteten och konfluensen för dessa celler väldigt låg (fig. 33–35). Däremot låg viabiliteten hos Lipofectamine®-behandlade celler i det andra experimentet på ca 70 %. Båda experimenten visar på samma viabilitetsnivå hos DMSO-behandlade celler,

dvs. runt 80 % (fig. 33). Sammanfattat är kontrollerna för dessa experiment ändamålsenliga.

Vid åskådande av konfluensgraferna från Incucyte Zoom märks en tydlig skillnad hos *ARID1A*-nedreglerade celler och celler transfekterade med en kontroll-siRNA (fig. 34), där cellerna vuxit väldigt långsamt i ARID1A NR. Detta tyder på att ARID1A är viktigt för OCCC. Märkväl, det var från början aningen mera celler i kontroll-plattan jämfört med ARID1A NR, vilket kan vara en del av orsaken till att ingen skillnad i dos-respons kunde märkas mellan dessa (fig. 33). På grund av att de ARID1A NR-cellerna inte kunde växa till konfluens blev skillnaderna i viabilitet och konfluens för små för att kunna avgöra en betydlig respons mot BET-hämmarna vid de mindre koncentrationerna, dvs. vid ≤ 300 nM av JQ1 och ≤ 1000 nM av iBET-762. Trots att cellantalet var aningen olik redan från början av dos-respons-experimenten hos ARID1A NR och kontroll bör inte den möjligheten att ARID1A-nedreglering påverkar proliferationshastigheten uteslutas.

En liknande undersökning har gjorts av Berns et al. på ES-2 med inaktiverat *ARID1A*, sk. knockoutceller som de skapat med CRISPR/Cas9-metoden. Metoden går ut på att identifiera målplatsen i genomet som ska modifieras med hjälp av en RNA-molekyl. När knockoutceller skapas, raderas den önskade genen helt och hållet från de transfekterade cellernas genom. Till skillnad från nedreglering med siRNA, som gjorts i detta arbete, leder CRISPR/Cas9-metoden till en långvarig verkan. Detta bör beaktas vid jämförelse av dessa två studier. I studien av Berns et al. visade vildtyps-ES-2 på signifikant bättre överlevnad mätt med en enzymatisk viabilitetsmetod CellTiter Blue vid hämning med JQ1 jämfört med knockoutcellerna. Samma resultat erhöles för vildtypscellinjen OVCA429 som även jämförts med *ARID1A*-knockoutceller (Berns et al., 2018). Eftersom den önskade genen har raderats i knockoutceller, är det möjligt att utföra en långtidsstudie med behandlade knockoutceller. Det är precis vad Berns et al. har gjort och funnit att knockoutcellerna under ett tidsspänn på månader anpassar sig till JQ1-behandlingen. Ty det är möjligt att andra mutationer i *ARID1A*-muterad OCCC leder till en mer stabil fenotyp än hos knockoutcellerna med endast avsaknad av *ARID1A* (Berns et al., 2018). Det är uppenbart synd att detta arbete inte kunde varken bekräfta eller motsäga dessa resultat på grund av en del misslyckade transfektioner.

Förutom knockout-experimenten har Berns et al. utfört xenograft-experiment där vildtyps-ES-2-celler injicerats i möss och mössen har sedan behandlats med JQ1 (50 mg/kg/dag). Som jämförelse användes xenograft-möss med *ARID1A*-muterade SMOV2-celler. En signifikant skillnad märktes mellan kontroll-behandlade och JQ1-behandlade möss med SMOV2-celler både i den uppkomna tumörstorleken och i vikten (Berns et al., 2018). Skillnaderna hos ES-2-xenograft-möss var icke-signifikant, vilket tyder på att *ARID1A*-mutation kunde förutbestämma responsen mot BET-hämmare. Liknande resultat märktes hos xenograft-möss med tumörer från patienter, specifikt en *ARID1A*-muterad och en vildtypstumör där den muterade tumören var betydligt känsligare mot BET-hämning än vildtypstumören (Berns et al., 2018). Den använda muterade tumören har däremot inte visat respons mot kemoterapi med carboplatin/paclitaxel hos patienten medan vildtypstumören visat full respons mot kemoterapi (Berns et al., 2018), vilket tyder på att BET-hämmare kunde vara det första läkemedlet att prova för *ARID1A*-muterad OCCC (eng. first line drug) i framtiden. Det krävs självklart betydligt mer undersökningar före detta blir aktuellt, speciellt för att klarlägga vad som är orsaken bakom de tvetydiga resultaten där *ARID1A*:s mutationsstatus inte alla gånger förutbestämmer responsen mot BET-hämmare. I följande avsnitt diskuteras några möjliga bakomliggande orsaker till detta och fortsatta studier för klarläggning.

6.2.4 Möjliga orsaker till den avvikande känsligheten för BET-hämmare oberoende av *ARID1A*-mutationsstatus

Många olika faktorer kan bidra till de tvetydiga resultaten angående känsligheten mot BET-hämmare. Som redan diskuterats, är val av analysmetod betydande för sanna resultat, därför bör typen av undersökning och läkemedel som undersöks beaktas. Även val av läkemedelskoncentrationer är viktigt för att hitta den optimala dosen för en ändamålsenlig verkan. I detta arbete har sex olika koncentrationer använts, vilka visats ge en tillräckligt bred omfattning för att identifiera en lämplig verkan hos varje cellinje (fig. 18A & 19A). Även läkemedlets stabilitet och renhet är väsentligt för den biologiska aktiviteten. Möjligheterna är många och därför diskuteras endast några möjliga orsaker utöver de ovannämnda till den avvikande känsligheten mot BET-hämmare.

Cellinjer som härstammar från människa är ett viktigt verktyg inom cellbiologin, även för läkemedelsundersökningar. Studierna är ändå endast lika bra som sina modeller. Därför är det väsentligt att reflektera över de använda cellinjerna i detta arbete. Av de *ARID1A*-muterade cellinjerna härstammar endast OVMANA från den primära tumören. Patienten, vars tumör OVMANA utvecklats från, hade behandlats med tre doser av cisplatin före cellinjen skapats (Yanagibashi et al., 1997). Däremot härstammar OVTOKO från en metastatisk tumör mot vilken patienten getts fem doser av tre anticancerläkemedel, nämligen cyklofosamid, adriamycin och cisplatin (Yanagibashi et al., 1997). TOV21G härstammar i sin tur från en metastatisk tumör i en äggstock (stadie III) från en patient som aldrig genomgått varken kemoterapi eller strålbehandling (Provencher et al., 2000). Det har föreslåtts att *ARID1A*-mutation uppkommer i ett tidigt skede i OCCC och driver cancerutvecklingen (Maeda et al., 2010) men eftersom både OVTOKO och TOV21G härstammar från en metastatisk tumör är det osannolikt att OCCC-stadiet förklarar känsligheten för BET-hämmare. Hursomhelst, med tanke på att OVMANA och OVTOKO ursprungligen har utsatts för cisplatin-behandling, som är den konventionella behandlingen mot OCCC (Pectasides et al., 2006a), verkar det lovande att just dessa cellinjer visar på stor känslighet för BET-hämmare. Av vildtypscellinjerna har ES-2:s ursprung inte rapporterats, medan RMG-1 härstammar från ascites, dvs. från vätskeansamling inne i bukhålan (Nozawa, Tsukazaki, Sakayori, Jeng, & Iizuka, 1988). Ty, RMG-1 härstammar också från ett metastatiskt stadie i OCCC.

Det är värt att notera ARID1B:s roll i *ARID1A*-muterad cancer. Dessa två ARID1-proteiner förekommer inte i samma SWI/SNF-komplex men de utövar samma funktioner i dessa komplex (Jones et al., 2009; Wu et al., 2009). Nedreglering av ARID1B hos *ARID1A*-muterade OCCC-cellinjer, såsom hos TOV21G, minskar signifikant cellernas proliferation (Helming et al., 2014). Däremot upptäcktes ingen signifikant skillnad i proliferationen hos vildtypscellinjer, såsom hos ES-2, efter nedregleringen (Helming et al., 2014). Liknande resultat upptäcktes i en studie av Berns et al. där vildtypscellinjer, inklusive ES-2, prolifererade lika bra efter nedreglering av ARID1B, medan *ARID1A*-muterade cellinjer påverkades betydligt av nedregleringen. Dessutom visade Berns et al. att vildtypscellinjen OVCA429 hade lägre ARID1B-mRNA- och -proteinnivå än OVCA429-celler vars *ARID1A* inaktiverats, sk. knockoutceller. Efter BET-hämning med 500 nM och 5000 nM av

JQ1 minskade ARID1B-mRNA- och -proteinnivåerna betydligt (Berns et al., 2018). Samma verkan märktes med nedreglering av BRD2; proteinet visades även binda till *ARID1B*-promotorn. Eftersom BRD4 inte band till denna promotor, tros BRD2 stå för denna effekt (Berns et al., 2018). Det vore intressant att undersöka ifall nivån av ARID1B är olik mellan de använda cellinjerna i detta arbete och ifall detta skulle korrelera med känsligheten mot BET-hämning. Spekulativt kunde därför RMG-1 vara mer känslig för BET-hämning än den andra vildtypscellinjen ES-2, eftersom ES-2 har nästan dubbelt större proteinnivå av ARID1A (fig. 37). RMG-1 kunde eventuellt kompensera denna skillnad med ARID1B och därvid påverkas mer av BET-hämning. Berns et al. fann en lika stor skillnad i ARID1A-proteinnivån mellan dessa cellinjer. Hursomhelst stöds inte spekulationen av upptäckten att mer BRD2 finns i ES-2 än i RMG-1 (fig. 36) men det kunde vara att en låg ARID1B-nivå skyddar ES-2 mot en annars större verkan från BET-hämning jämfört med RMG-1. Av de muterade cellinjerna visade endast OVMANA en större proteinnivå av BRD2 och BRD4 (fig. 36), vilket inte kan enskilt relateras med känsligheten mot BET-hämmare, eftersom OVTOKO visade en större respons mot hämningen än OVMANA medan TOV21G var rätt så resistent (t.ex. fig. 18 & 19).

PIK3CA och serin–treonin proteinfosfatsets regulatoriska subenhet *PP2R1A* är ofta muterade i OCCC tillsammans med *ARID1A* (Chandler et al., 2015; Jones et al., 2010). På grund av att dessa mutationer ofta förekommer i samma tumörer, speciellt *ARID1A-PIK3CA* som förekommer i en tredjedel av OCCC-fall (Chandler et al., 2015), skulle dessa mutationsstatusar kunna ge en indikation på känsligheten mot BET-hämmare. Därför kunde ofta förekommande sammutationers (eng. co-mutation) kartläggning i de använda OCCC-cellerna vara ett mål för framtida studier. Intressant nog, har det visats att TOV21G har både *ARID1A*- och *PIK3CA*-mutation (Kim, Lu, & Zhang, 2016). Måne detta kunde förklara dess resistens mot BET-hämmare bland *ARID1A*-muterade OCCC-celler.

Eftersom detta arbete inte har undersökt BRD3-proteinnivåerna hos de olika cellinjerna, är det möjligt att redan detta skulle ge indikationer på känsligheten mot BET-hämmare. Den bäst kända funktionen av detta protein är dess interaktion med transkriptionsfaktorn GATA-1 (Gamsjaeger et al., 2011; Lamonica et al., 2011), vilket tros vara den bakomliggande orsaken till att BET-hämmare i fas I kliniska studier visat på toxicitet som uttryckts som trombocytopeni, dvs. brist på trombocyter (Cochran,

Conery, & Sims, 2019; Xu & Vakoc, 2017). Fler funktionella studier av BET-proteiner krävs för att finna det ändamålsenliga BET-proteinet som bör hämmas för att minska den toxiska verkan och uppnå den mest fördelaktiga kliniska effekten.

6.3 Kliniska studier och framtida visioner

Flera kliniska studier med BET-hämmare, mestadels för cancer, är pågående och alla är ännu i ett tidigt utvecklingsskede (fas I-II) (Cochran et al., 2019). Cancerceller är skickliga på att undgå kemoterapi, antingen genom en inneboende resistens eller en anpassning till anticancerläkemedel (Cochran et al., 2019; Settleman, 2016). Därför undersöks även flera kombinationer av kemoterapi tillsammans med BET-hämmare i kliniken, t.ex. venetoclax som hämmar det anti-apoptotiska proteinet Bcl2 samt exemestane och fulvestrant som används för behandling av bröstcancer (Cochran et al., 2019). Med tanke på de ofta förekommande mutationerna i *PIK3CA* och *ARID1A* i OCCC (Chandler et al., 2015), vore PI3K-hämmare betydelsefulla läkemedel att undersöka i kombination med BET-hämmare för att bekämpa cancerresistens och eliminera cancercellerna. Till exempel har en ledtråds molekyl (eng. lead compound) som hämmar både BRD4 och PI3K utvecklats för *MYC*-muterade cancerformer (Andrews et al., 2017). Denna hämmare kunde även vara av intresse för *in vitro*-studier i *ARID1A*-muterad OCCC, speciellt om BRD4 visas stå för den terapeutiska effekten i denna cancerform. Hursomhelst, eftersom denna hämmare är en ledtråds molekyl förväntas många års arbete för att optimera hämmaren till ett säkert och verksamt läkemedel som i bästa fall kunde undersökas i kliniska studier. Därför är det mer aktuellt att studera BET-hämmare tillsammans med redan godkända PI3K-hämmare i kliniska studier inom en snarare framtid om det visar sig att denna kombination ger en bra respons hos *ARID1A-PIK3CA*-muterad OCCC. Ett bra exempel på en marknadsgodkänd PI3K-hämmare är Alpelisib (Piqray™) som i kombination med fulvestrant har godkänts nyligen av den amerikanska läkemedelsmyndigheten The Food and Drug Administration (FDA) för behandling av bröstcancer hos patienter med *PIK3CA*-mutation (Markham, 2019). Kliniska studier med BET-hämmare och marknadsgodkända PI3K-hämmare för behandling av *ARID1A*-muterad OCCC är ännu en ambitiös framtidsvision som kräver en hel del *in vitro*- och prekliniska studier för att visa på dessa hämmares specifika verkan på denna cancerform.

7. Sammanfattning

ARID1A-muterade OCCC-cellinjer studerades i relation till vildtypscellinjer för att undersöka en specifik känslighet mot BET-hämmare hos de muterade cellerna. Ingen uppenbar skillnad i känslighet upptäcktes mellan ovannämnda grupper. Skillnaderna kunde inte heller relateras till proteinnivån av BRD2 och BRD4. Det är däremot möjligt att en skillnad i proteinnivån hos BRD3 förklarar skillnaderna i känslighet, eftersom detta inte har undersökts. Även ARID1B-proteinnivån kunde förklara skillnaderna, eftersom avsaknad av båda ARID1-proteinerna har visats vara syntetiskt letal och BET-hämmare verkar nedreglera ARID1B. Vidare studier om BRD3 och ARID1B i *ARID1A*-muterad cancer är rättfärdigade. Många förändringar krävs för att cancer ska uppkomma, därvid kan även många mutationer bidra till responsen mot anticancerläkemedel. En mutation som ofta förekommer i OCCC, även tillsammans med *ARID1A*, är *PIK3CA*. Därför kunde också undersökning av dessa sammutationer vara en väsentlig fördjupning i detta ämne för fortsatta studier. Bland de tre undersökta *ARID1A*-muterade cellinjerna i detta arbete, var TOV21G den enda som visade resistens mot BET-hämmare; förutom *ARID1A* har denna cellinje även *PIK3CA*-mutation. Därför vore speciellt studier med BET-hämmare tillsammans med PI3K-hämmare befogade ifall denna kombination kunde relateras till en större känslighet hos *ARID1A-PIK3CA*-muterad OCCC. Om denna kombination av läkemedel visar sig vara säker och effektiv mot *ARID1A*-muterad och eventuellt *PIK3CA*-muterad OCCC hos människor, torde vetenskapsmän kunna ta itu med det ofta förekommande problemet med anticancerresistens i denna cancerform och öka utbudet av behandlingar inriktade på personlig medicin för betydligt bättre överlevnad och livskvalitet hos patienter.

Bilagor

Bilaga 1: Recept på använda lösningar

EDTA

8,9 mM Dinatrium-EDTA (etylendiamintetraättiksyra)

136,9 mM Natriumklorid

6,67 mM Natriumbikarbonat

5,55 mM Dextros

5,37 mM Kaliumklorid

Upplöst i dubbeldestillerat vatten (MQ-vatten)

3x Laemmli lyseringsbuffert

30 % Glycerol

3 % SDS

187,5 mM Tris-Cl, pH 6,8

0,015 % Bromfenolblått

3 % Merkaptoetanol

10x SDS-PAGE-körbuffert

250 mM Tris

2 M Glycin

0,1 % SDS

5x överföringsbuffert

300 mM Tris

39 mM Glycin

20 % Metanol

Litteraturförteckning

References

- Abedin, S. M., Boddy, C. S., & Munshi, H. G. (2016). BET inhibitors in the treatment of hematologic malignancies: Current insights and future prospects. *OncoTargets and Therapy*, 9, 5943–5953.
- Allsopp, R. C., Chang, E., Kashefi-Azham, M., Rogaev, E. I., Piatyszek, M. A., Shay, J. W., & Harley, C. B. (1995). Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo. *Experimental Cell Research*, 220, 194–200.
- Andrews, F. H., Singh, A. R., Joshi, S., Smith, C. A., Morales, G. A., Garlich, J. R., Durden, D. L. & Kutateladze, T. G. (2017). Dual-activity PI3K–BRD4 inhibitor for the orthogonal inhibition of MYC to block tumor growth and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114, 1072–1080.
- Attwooll, C., Denchi, E. L., & Helin, K. (2004). The E2F family: Specific functions and overlapping interests. *The EMBO Journal*, 23, 4709–4716.
- Banerjee, S., & Kaye, S. B. (2013). New strategies in the treatment of ovarian cancer: Current clinical perspectives and future potential. *Clinical Cancer Research*, 19, 961–968.
- Baratta, M. G., Schinzel, A. C., Zwang, Y., Bandopadhyay, P., Bowman-Colin, C., Kutt, J., Curtis, J., Piao, H., Wong, L. C., Kung, A. L., Beroukhim, R., Bradner, J. E., Drapkin, R., Hahn, W. C., Liu, J. F. & Livingston, D. M. (2015). An in-tumor genetic screen reveals that the BET bromodomain protein, BRD4, is a

- potential therapeutic target in ovarian carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 232–237.
- Batsché, E., Yaniv, M., & Muchardt, C. (2006). The human SWI/SNF subunit brm is a regulator of alternative splicing. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13, 22–29.
- Berns, K., Caumanns, J. J., Hijmans, E. M., Gennissen, A. M., Severson, T. M., Evers, B., Wisman, G. B. A., Meersma, G. J., Liefink, C., Beijersbergen, R. L., Itamochi, H., van der Zee, A. G. J., de Jong, S. & Bernards, R. (2018). ARID1A mutation sensitizes most ovarian clear cell carcinomas to BET inhibitors. *Oncogene*, 37, 4611–4625.
- Berridge, M. V., Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11, 127–152.
- Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C., Morin, G. B., Harley, C. B., Shay, J. W., Lichtsteiner, S. & Wright, W. E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, 279, 349–352.
- Boyer, A., Walter, D., & Sørensen, C. S. (2016). DNA replication and cancer: From dysfunctional replication origin activities to therapeutic opportunities. *Seminars in Cancer Biology*, 37, 16–25.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and

- mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68, 394–424.
- Cannon, W. B. (1929). Organization for physiological homeostasis. *Physiological Reviews*, 9, 399–431.
- Chan, J. K., Teoh, D., Hu, J. M., Shin, J. Y., Osann, K., & Kapp, D. S. (2008). Do clear cell ovarian carcinomas have poorer prognosis compared to other epithelial cell types? A study of 1411 clear cell ovarian cancers. *Gynecologic Oncology*, 109, 370–376.
- Chandler, R. L., Brennan, J., Schisler, J. C., Serber, D., Patterson, C., & Magnuson, T. (2013). ARID1a-DNA interactions are required for promoter occupancy by SWI/SNF. *Molecular and Cellular Biology*, 33, 265–280.
- Chandler, R. L., Damrauer, J. S., Raab, J. R., Schisler, J. C., Wilkerson, M. D., Didion, J. P., Starmer, J., Serber, D., Yee, D., Xiong, J., Darr, D. B., de Villena, P. M. F., Kim, W. Y., & Magnuson, T. (2015). Coexistent ARID1A–PIK3CA mutations promote ovarian clear-cell tumorigenesis through pro-tumorigenic inflammatory cytokine signalling. *Nature Communications*, 6, 6118.
- Chapeville, F., Lipmann, F., Von Ehrenstein, G., Weisblum, B., Ray Jr, W. J., & Benzer, S. (1962). On the role of soluble ribonucleic acid in coding for amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 48, 1086–1092.
- Cochran, A. G., Conery, A. R., & Sims, R. J. (2019). Bromodomains: A new target class for drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 18, 609–628.

- Cosma, M. P. (2002). Ordered recruitment: Gene-specific mechanism of transcription activation. *Molecular Cell*, 10, 227–236.
- Coussens, L. M., & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420, 860–867.
- Cox, P. M., & Goding, C. R. (1991). Transcription and cancer. *British Journal of Cancer*, 63, 651–662.
- Crowley, T. E., Kaine, E. M., Yoshida, M., Nandi, A., & Wolgemuth, D. J. (2002). Reproductive cycle regulation of nuclear import, euchromatic localization, and association with components of pol II mediator of a mammalian double-bromodomain protein. *Molecular Endocrinology*, 16, 1727–1737.
- Davey, C., Pennings, S., & Allan, J. (1997). CpG methylation remodels chromatin structure in vitro. *Journal of Molecular Biology*, 267, 276–288.
- De Angelis, R., Sant, M., Coleman, M. P., Francisci, S., Baili, P., Pierannunzio, D., Trama, A., Visser, O., Brenner, H., Ardanaz, E. Bielska-Lasota, M., Engholm, G., Nennecke, A., Siesling, S., Berrino, F., Capocaccia, R., & EURO CARE-5 Working Group. (2014). Cancer survival in europe 1999–2007 by country and age: Results of EURO CARE-5—a population-based study. *The Lancet Oncology*, 15, 23–34.
- De Cecco, L., Marchionni, L., Gariboldi, M., Reid, J. F., Lagonigro, M. S., Caramuta, S., Ferrario, C., Bussani, E., Mezzanzanica, D., Turatti, F., Delia, D., Daidone, M. G., Oggionni, M., Bertuletti, N., Ditto, A., Raspagliesi, F., Pilotti, S., Pierotti, M. A., Canevari, S., & Schneider, C. (2004). Gene expression

profiling of advanced ovarian cancer: Characterization of a molecular signature involving fibroblast growth factor 2. *Oncogene*, 23, 8171–8183.

Delmore, J. E., Issa, G. C., Lemieux, M. E., Rahl, P. B., Shi, J., Jacobs, H. M., Kastritis, E., Gilpatrick, T., Paranal, R. M., Qi, J., Chesi, M., Schinzel, A. C., McKeown, M. R., Heffeman, T. P., Vakoc, C. R., Bergsagel, P. L., Gobrial, I. M., Richardson, P. G., Young, R. A., Hahn, W. C., Anderson, K. C., Kung, A. L., Bradner, J. E., & Mitsiades, C. S. (2011). BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-myc. *Cell*, 146, 904–917.

Denis, G. V., Vaziri, C., Guo, N., & Faller, D. V. (2000). RING3 kinase transactivates promoters of cell cycle regulatory genes through E2F. *Cell Growth & Differentiation : The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research*, 11, 417–424.

Denis, G. V., McComb, M. E., Faller, D. V., Sinha, A., Romesser, P. B., & Costello, C. E. (2006). Identification of transcription complexes that contain the double bromodomain protein Brd2 and chromatin remodeling machines. *Journal of Proteome Research*, 5, 502–511.

Dey, A., Chitsaz, F., Abbasi, A., Misteli, T., & Ozato, K. (2003). The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 8758–8763.

Fidler, I. J. (1978). Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Research*, 38, 2651–2660.

- Filippakopoulos, P., Qi, J., Picaud, S., Shen, Y., Smith, W. B., Fedorov, O., Morse, E.M., Keates, T., Hickman, T. T., Felletar, I., Philpott, M., Munro, S., McKeown, M. R., Wang, Y., Christie, A. L., West, N., Cameron, M. J., Schwartz, B., Heightman, T. D., La Thangue, N., French, C. A., Wiest, O., Kung, A. L., Knapp, S., & Bradner, J. E. (2010). Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature*, *468*, 1067–1073.
- Florence, B., & Faller, D. V. (2001). You bet-cha: A novel family of transcriptional regulators. *Frontiers in Bioscience*, *6*, 1008–1018.
- Friedl, P., & Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews Cancer*, *3*, 362–374.
- Gamsjaeger, R., Webb, S. R., Lamonica, J. M., Billin, A., Blobel, G. A., & Mackay, J. P. (2011). Structural basis and specificity of acetylated transcription factor GATA1 recognition by BET family bromodomain protein Brd3. *Molecular and Cellular Biology*, *31*, 2632–2640.
- Glasspool, R. M., & McNeish, I. A. (2013). Clear cell carcinoma of ovary and uterus. *Current Oncology Reports*, *15*, 566–572.
- Grigoryev, S. A., & Woodcock, C. L. (2012). Chromatin organization—the 30 nm fiber. *Experimental Cell Research*, *318*, 1448–1455.
- Gros, F., Gilbert, W., Hiatt, H. H., Attardi, G., Spahr, P. F., & Watson, J. D. (1961). Molecular and biological characterization of messenger RNA. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *26*, 111–132.

- Guan, B., Mao, T., Panuganti, P. K., Kuhn, E., Kurman, R. J., Maeda, D., Chen, E., Jeng, Y. M., Wang, T. L., & Shih, I. (2011). Mutation and loss of expression of ARID1A in uterine low-grade endometrioid carcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology*, 35, 625–632.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144, 646–674.
- Hargreaves, D. C. (2011). ATP-dependent chromatin remodeling: Genetics, genomics and mechanisms. *Cell Research*, 21, 396–420.
- Harikrishnan, K. N., Chow, M. Z., Baker, E. K., Pal, S., Bassal, S., Brasacchio, D., Wang, L., Craig, J. M., Jones, P. L., Sif, S., & El-Osta, A. (2005). Brahma links the SWI/SNF chromatin-remodeling complex with MeCP2-dependent transcriptional silencing. *Nature Genetics*, 37, 254–264.
- Harley, C. B., Futcher, A. B., & Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345, 458–460.
- Helming, K. C., Wang, X., Wilson, B. G., Vazquez, F., Haswell, J. R., Manchester, H. E., Kim, Y., Kryukov, G. V., Ghandi, M., Aguirre, A. J., Jagani, Z., Wang, Z., Garraway, L. A., Hahn, W. C., & Roberts, C. W. (2014). ARID1B is a specific vulnerability in ARID1A-mutant cancers. *Nature Medicine*, 20, 251–254.
- Hnilicová, J., Hozeifi, S., Stejskalová, E., Dušková, E., Poser, I., Humpolíčková, J., Hof, M., & Staněk, D. (2013). The C-terminal domain of Brd2 is important for

chromatin interaction and regulation of transcription and alternative splicing.

Molecular Biology of the Cell, 24, 3557–3568.

Hodge, D. R., Hurt, E. M., & Farrar, W. L. (2005). The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *European Journal of Cancer*, 41, 2502–2512.

Hongit, L., Schroth, G. P., Matthews, H. R., Yauř, P., & Bradbury, E. M. (1993). Studies of the DNA. binding properties of histone H4 amino terminus. *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 305–314.

Iborra, F. J., Jackson, D. A., & Cook, P. R. (2001). Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells. *Science*, 293, 1139–1142.

Jacob, F., & Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology*, 3, 318–356.

Jacobson, R. H., Ladurner, A. G., King, D. S., & Tjian, R. (2000). Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science (New York, N.Y.)*, 288, 1422–1425.

Jones, S., Wang, T. L., Shih, I., Mao, T. L., Nakayama, K., Roden, R., Glas, R., Slamon, D., Diaz, L. A. Jr, Vogelstein, B., Kinzler, K. W., Velculescu, V. E., & Papadopoulos, N. (2010). Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma. *Science (New York, N.Y.)*, 330, 228–231.

Jordan, M. A., Thrower, D., & Wilson, L. (1992). Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles. implications for the role of microtubule dynamics in mitosis. *Journal of Cell Science*, 102, 401–416.

- Kamakaka, R. T., & Biggins, S. (2005). Histone variants: Deviants? *Genes & Development*, *19*, 295–316.
- Kanno, T., Kanno, Y., Siegel, R. M., Jang, M. K., Lenardo, M. J., & Ozato, K. (2004). Selective recognition of acetylated histones by bromodomain proteins visualized in living cells. *Molecular Cell*, *13*, 33–43.
- Karakashev, S., Zhu, H., Yokoyama, Y., Zhao, B., Fatkhutdinov, N., Kossenkova, A. V., Wilson, A. J., Simpkins, F., Speicher, D., Khabele, D., Bitler, B. G., & Zhang, R. (2017). BET bromodomain inhibition synergizes with PARP inhibitor in epithelial ovarian cancer. *Cell Reports*, *21*, 3398–3405.
- Khan, A., Mathelier, A., & Zhang, X. (2018). Super-enhancers are transcriptionally more active and cell type-specific than stretch enhancers. *Epigenetics*, *13*, 910–922.
- Kim, M., Lu, F., & Zhang, Y. (2016). Loss of HDAC-mediated repression and gain of NF- κ B activation underlie cytokine induction in ARID1A- and PIK3CA- mutation-driven ovarian cancer. *Cell Reports*, *17*, 275–288.
- Kingston, R. E., & Narlikar, G. J. (1999). ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes & Development*, *13*, 2339–2352.
- Kornberg, R. D. (1974). Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. *Science*, *184*, 868–871.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, *128*, 693–705.

- Koyanagi, M., Kawakabe, S., & Arimura, Y. (2016). A comparative study of colorimetric cell proliferation assays in immune cells. *Cytotechnology*, 68, 1489–1498.
- Krishnamurthy, S., & Hampsey, M. (2009). Eukaryotic transcription initiation. *Current Biology*, 19, 153–156.
- Lakshminarasimhan, R., Andreu-Vieyra, C., Lawrenson, K., Duymich, C. E., Gayther, S. A., Liang, G., & Jones, P. A. (2017). Down-regulation of ARID1A is sufficient to initiate neoplastic transformation along with epigenetic reprogramming in non-tumorigenic endometriotic cells. *Cancer Letters*, 401, 11–19.
- Lamonica, J. M., Deng, W., Kadauke, S., Campbell, A. E., Gamsjaeger, R., Wang, H., Cheng, Y., Billin, A. N., Hardison, R. C., Mackay, J. P. & Blobel, G. A. (2011). Bromodomain protein Brd3 associates with acetylated GATA1 to promote its chromatin occupancy at erythroid target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 159–168.
- Lau, D. H., Lewis, A. D., Ehsan, M. N., & Sikic, B. I. (1991). Multifactorial mechanisms associated with broad cross-resistance of ovarian carcinoma cells selected by cyanomorpholino doxorubicin. *Cancer Research*, 51, 5181–5187.
- Lengyel, E. (2010). Ovarian cancer development and metastasis. *The American Journal of Pathology*, 177, 1053–1064.

- LeRoy, G., Rickards, B., & Flint, S. J. (2008). The double bromodomain proteins Brd2 and Brd3 couple histone acetylation to transcription. *Molecular Cell*, 30, 51–60.
- Lewis, J. D., Meehan, R. R., Henzel, W. J., Maurer-Fogy, I., Jeppesen, P., Klein, F., & Bird, A. (1992). Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell*, 69, 905–914.
- Li, G., & Reinberg, D. (2011). Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Current Opinion in Genetics & Development*, 21, 175–186.
- Li, H. J. (1975). A model for chromatin structure. *Nucleic Acids Research*, 2, 1275–1290.
- Lifton, R. P., Goldberg, M. L., Karp, R. W., & Hogness, D. S. (1978). The organization of the histone genes in drosophila melanogaster: Functional and evolutionary implications. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 42, 1047–1051.
- Lim, M. C., Lee, D. O., Kang, S., Seo, S., Lee, B., & Park, S. (2009). Clinical manifestations in patients with ovarian clear cell carcinoma with or without co-existing endometriosis. *Gynecological Endocrinology*, 25, 435–440.
- Lovén, J., Hoke, H. A., Lin, C. Y., Lau, A., Orlando, D. A., Vakoc, C. R., Bradner, J. E., Lee, T. I., & Young, R. A. (2013). Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell*, 153, 320–334.
- Loyola, A., & Almouzni, G. (2004). Bromodomains in living cells participate in deciphering the histone code. *Trends in Cell Biology*, 14, 279–281.

- Luco, R. F., Pan, Q., Tominaga, K., Blencowe, B. J., Pereira-Smith, O. M., & Misteli, T. (2010). Regulation of alternative splicing by histone modifications. *Science*, 327, 996–1000.
- Ma, J. (2006). Transcriptional activators and activation mechanisms. *Gene expression and regulation* (pp. 147-158) Springer.
- Maeda, D., Mao, T. L., Fukayama, M., Nakagawa, S., Yano, T., Taketani, Y., & Shih, I. (2010). Clinicopathological significance of loss of ARID1A immunoreactivity in ovarian clear cell carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 5120–5128.
- Mamo, A., Cavallone, L., Tuzmen, S., Chabot, C., Ferrario, C., Hassan, S., Edgren, H., Kallioniemi, O., Aleynikova, O., Przybytkowski, E., Malcolm, K., Mousses, S., Tonin, P. N., & Basik, M. (2012). An integrated genomic approach identifies ARID1A as a candidate tumor-suppressor gene in breast cancer. *Oncogene*, 31, 2090–2100.
- Markham, A. (2019). Alpelisib: First global approval. *Drugs*, 79, 1249–1253.
- Martens, J. A., & Winston, F. (2003). Recent advances in understanding chromatin remodeling by swi/snf complexes. *Current Opinion in Genetics & Development*, 13, 136–142.
- Mathur, R. (2018). ARID1A loss in cancer: Towards a mechanistic understanding. *Pharmacology & Therapeutics*, 190, 15–23.
- Mathur, R., Alver, B. H., San Roman, A. K., Wilson, B. G., Wang, X., Agoston, A. T., Park, P. J., Shivdasani, R. A., & Roberts, C. W. (2017). ARID1A loss

impairs enhancer-mediated gene regulation and drives colon cancer in mice.

Nature Genetics, 49, 296–302.

McGarry, T. J., & Kirschner, M. W. (1998). Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. *Cell*, 93, 1043–1053.

Mengeritsky, G., & Trifonov, E. N. (1983). Nucleotide sequence-directed mapping of the nucleosomes. *Nucleic Acids Research*, 11, 3833–3851.

Middeljans, E., Wan, X., Jansen, P. W., Sharma, V., Stunnenberg, H. G., & Logie, C. (2012). SS18 together with animal-specific factors defines human BAF-type SWI/SNF complexes. *PLoS One*, 7, e33834.

Miller, S. A., Mohn, S. E., & Weinmann, A. S. (2010). Jmjd3 and UTX play a demethylase-independent role in chromatin remodeling to regulate T-box family member-dependent gene expression. *Molecular Cell*, 40, 594–605.

Modrich, P., & Lahue, R. (1996). Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annual Review of Biochemistry*, 65, 101–133.

Moore, M. J., & Proudfoot, N. J. (2009). Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell*, 136, 688–700.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55–63.

- Nagl, N. G., Wang, X., Patsialou, A., Van Scoy, M., & Moran, E. (2007). Distinct mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complexes with opposing roles in cell-cycle control. *The EMBO Journal*, 26, 752–763.
- Nicodeme, E., Jeffrey, K. L., Schaefer, U., Beinke, S., Dewell, S., Chung, C., Chandwani, R., Marazzi, I., Wilson, P., Coste, H., White, J., Kirilovsky, J., Rice, C. M., Lora, J. M., Prinjha R. K., Lee, K., & Tarakhovsky, A. (2010). Suppression of inflammation by a synthetic histone mimic. *Nature*, 468, 1119–1123.
- Nozawa, S., Tsukazaki, K., Sakayori, M., Jeng, C. H., & Iizuka, R. (1988). Establishment of a human ovarian clear cell carcinoma cell line (RMG-I) and its single cell cloning--with special reference to the stem cell of the tumor. *Human Cell*, 1, 426–435.
- Orphanides, G., Lagrange, T., & Reinberg, D. (1996). The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes & Development*, 10, 2657–2683.
- Ott, C. J., Kopp, N., Bird, L., Paranal, R. M., Qi, J., Bowman, T., Rodig, S. J., Kung, A. L., Bradner, J. E., & Weinstock, D. M. (2012). BET bromodomain inhibition targets both c-myc and IL7R in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 120, 2843–2852.
- Pecorelli, S., Benedet, J. L., Creasman, W. T., & Shepherd, J. H. (1999). FIGO staging of gynecologic cancer. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 65, 243–249.

- Pectasides, D., Fountzilas, G., Aravantinos, G., Kalofonos, C., Efstathiou, H., Farmakis, D., Skarlos, D., Pavlidis, N., Economopoulos, T., & Dimopoulos, M. A. (2006b). Advanced stage clear-cell epithelial ovarian cancer: The hellenic cooperative oncology group experience. *Gynecologic Oncology*, *102*, 285–291.
- Pectasides, D., Pectasides, E., Psyrri, A., & Economopoulos, T. (2006a). Treatment issues in clear cell carcinoma of the ovary: A different entity? *The Oncologist*, *11*, 1089–1094.
- Peterson, C. L., & Laniel, M. (2004). Histones and histone modifications. *Current Biology*, *14*, 546–551.
- Portin, P., & Wilkins, A. (2017). The evolving definition of the term “gene”. *Genetics*, *205*, 1353–1364.
- Poss, Z. C., Ebmeier, C. C., & Taatjes, D. J. (2013). The mediator complex and transcription regulation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *48*, 575–608.
- Provencher, D. M., Lounis, H., Champoux, L., Tétrault, M., Manderson, E. N., Wang, J. C., Eydoux, P., Savoie, R., Tonin, P. N., & Mes-Masson, A. M. (2000). Characterization of four novel epithelial ovarian cancer cell lines. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. *Animal*, *36*, 357–361.
- Puissant, A., Frumm, S. M., Alexe, G., Bassil, C. F., Qi, J., Chanthery, Y. H., Nekritz, E. A., Zeid, R., Gustafson, W. C., Greninger, P., Garnett, M. J., McDermott, U., Benes, C. H., Kung, A. L., Weiss, W. A., Bradner, J. E., &

- Stegmaier, K. (2013). Targeting MYCN in neuroblastoma by BET bromodomain inhibition. *Cancer Discovery*, 3, 308–323.
- Rahman, S., Sowa, Matthew E. Ottinger, Matthias, Smith, J. A., Shi, Y., Harper, J. W., & Howley, P. M. (2011). The Brd4 extraterminal domain confers transcription activation independent of pTEFb by recruiting multiple proteins, including NSD3. *Molecular and Cellular Biology*, 31, 2641–2652.
- Rahmanto, Y. S., Jung, J., Wu, R., Kobayashi, Y., Heaphy, C. M., Meeker, A. K., Wang, T.L., & Shih, I. (2016). Inactivating ARID1A tumor suppressor enhances TERT transcription and maintains telomere length in cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 291, 9690–9699.
- Razin, A., & Cedar, H. (1991). DNA methylation and gene expression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 55, 451–458.
- Reid, B. M., Permuth, J. B., & Sellers, T. A. (2017). Epidemiology of ovarian cancer: A review. *Cancer Biology & Medicine*, 14, 9–32.
- Richards, E. J., & Elgin, S. C. (2002). Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: Rounding up the usual suspects. *Cell*, 108, 489–500.
- Ris, H., & Kubai, D. F. (1970). Chromosome structure. *Annual Review of Genetics*, 4, 263–294.
- Rotwein, P., Pollock, K. M., Didier, D. K., & Krivi, G. G. (1986). Organization and sequence of the human insulin-like growth factor I gene. alternative RNA processing produces two insulin-like growth factor I precursor peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 261, 4828–4832.

- Sarkies, P., & Sale, J. E. (2012). Cellular epigenetic stability and cancer. *Trends in Genetics*, 28, 118–127.
- Schaller, M. D. (2001). Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1540, 1–21.
- Schaller, M. D., Borgman, C. A., & Parsons, J. T. (1993). Autonomous expression of a noncatalytic domain of the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase pp125FAK. *Molecular and Cellular Biology*, 13, 785–791.
- Scheel, C., Onder, T., Karnoub, A., & Weinberg, R. A. (2007). Adaptation versus selection: The origins of metastatic behavior. *Cancer Research*, 67, 11476–11480.
- Schröterová, L., Králová, V., Voráčová, A., Hašková, P., Rudolf, E., & Červinka, M. (2009). Antiproliferative effects of selenium compounds in colon cancer cells: Comparison of different cytotoxicity assays. *Toxicology in Vitro*, 23, 1406–1411.
- Schulz, T. F., Kiss, C., Szekely, L., Platt, G. M., Simpson, G. R., Kashuba, E., Klein, G., & Mattsson, K. (2002). Latent nuclear antigen of kaposi's sarcoma herpesvirus/human herpesvirus-8 induces and relocates RING3 to nuclear heterochromatin regions. *Journal of General Virology*, 83, 179–188.
- Seppä, K. Syövät vuonna 2030. *Syöpäjärjestöt*. Hämtad 12 juli 2019 från: <https://www.syopajarjestot.fi/julkaisut/raportit/syopa-suomessa-2016/syovat-vuonna-2030/>
- Settleman, J. (2016). Cancer: Bet on drug resistance. *Nature*, 529, 289–290.

Shain, A. H., Giacomini, C. P., Matsukuma, K., Karikari, C. A., Bashyam, M. D.,

Hidalgo, M., Maitra, A., & Pollack, J. R. (2012). Convergent structural alterations define SWItch/sucrose NonFermentable (SWI/SNF) chromatin remodeler as a central tumor suppressive complex in pancreatic cancer.

Proceedings of the National Academy of Sciences, 109, E252–E259.

Shi, J., Wang, Y., Zeng, L., Wu, Y., Deng, J., Zhang, Q., Lin, Y., Li, J., Kang, T.,

Tao, M., Rusinova, E., Zhang, G., Wang, C., Zhu, H., Yao, J., Zeng, Y. X.,

Evers, B. M., Zhou, M. M., & Zhou, B. P. (2014). Disrupting the interaction of BRD4 with diacetylated twist suppresses tumorigenesis in basal-like breast cancer. *Cancer Cell*, 25, 210–225.

Shi, J., & Vakoc, C. R. (2014). The mechanisms behind the therapeutic activity of

BET bromodomain inhibition. *Molecular Cell*, 54, 728–736.

Sif, S., Saurin, A. J., Imbalzano, A. N., & Kingston, R. E. (2001). Purification and

characterization of mSin3A-containing Brg1 and hBrm chromatin remodeling complexes. *Genes & Development*, 15, 603–618.

Śliwka, L., Wiktorska, K., Suchocki, P., Milczarek, M., Mielczarek, S., Lubelska, K.,

Cerpial, T., Lyzwa, P., Kiełbasiński P, Jaromin, A., Flis, A., & Chilmonczyk, Z.

(2016). The comparison of MTT and CVS assays for the assessment of anticancer agent interactions. *PloS One*, 11, e0155772.

Sokolosky, M. L., & Wargovich, M. J. (2012). Homeostatic imbalance and colon

cancer: The dynamic epigenetic interplay of inflammation, environmental

toxins, and chemopreventive plant compounds. *Frontiers in Oncology*, 2, 57.

- Sood, A. K., Coffin, J. E., Schneider, G. B., Fletcher, M. S., DeYoung, B. R., Gruman, L. M., Gershenson, D. M., Schaller, M. D., & Hendrix, M. J. (2004). Biological significance of focal adhesion kinase in ovarian cancer: Role in migration and invasion. *The American Journal of Pathology*, 165, 1087–1095.
- Stein, R., Sciaky-Gallili, N., Razin, A., & Cedar, H. (1983). Pattern of methylation of two genes coding for housekeeping functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80, 2422–2426.
- Suomen syöpärekisteri (2019). Syöpä 2016. Hämtad 12 juli 2019 från: <https://syoparekisteri.fi/tilastot/syopa-2016-raportti/>
- Tang, L., Nogales, E., & Ciferri, C. (2010). Structure and function of SWI/SNF chromatin remodeling complexes and mechanistic implications for transcription. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 102, 122–128.
- Thoma, F., Koller, T., & Klug, A. (1979). Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *The Journal of Cell Biology*, 83, 403–427.
- Torre, L. A., Islami, F., Siegel, R. L., Ward, E. M., & Jemal, A. (2017). Global cancer in women: Burden and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 26, 444–457.
- Trifonov, E. N. (2010). Nucleosome positioning by sequence, state of the art and apparent finale. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 27, 741–746.

- Vitale, A., Ceriotti, A., & Denecke, J. (1993). The role of the endoplasmic reticulum in protein synthesis, modification and intracellular transport. *Journal of Experimental Botany*, 44, 1417–1444.
- Voulgari, A., & Pintzas, A. (2009). Epithelial–mesenchymal transition in cancer metastasis: Mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1796, 75–90.
- Wadhwa, E., & Nicolaides, T. (2016). Bromodomain inhibitor review: Bromodomain and extra-terminal family protein inhibitors as a potential new therapy in central nervous system tumors. *Cureus*, 8, e620.
- Wang, C., & Filippakopoulos, P. (2015). Beating the odds: BETs in disease. *Trends in Biochemical Sciences*, 40, 468–479.
- Wang, G. G., Allis, C. D., & Chi, P. (2007a). Chromatin remodeling and cancer, part I: Covalent histone modifications. *Trends in Molecular Medicine*, 13, 363–372.
- Wang, G. G., Allis, C. D., & Chi, P. (2007b). Chromatin remodeling and cancer, part II: ATP-dependent chromatin remodeling. *Trends in Molecular Medicine*, 13, 373–380.
- Wang, K., Kan, J., Yuen, S. T., Shi, S. T., Chu, K. M., Law, S., Chan, A. S., Tsui, W. Y., Lee, S. P., Ho, S. L., Chan, A. K., Cheng, G. H., Roberts, P. C., Rejto, P. A., Gibson, N. W., Pocalyko, D. J., Mao, M., Xu, J., & Leung, S. Y. (2011). Exome sequencing identifies frequent mutation of ARID1A in molecular subtypes of gastric cancer. *Nature Genetics*, 43, 1219–1223.

- Wang, X., Haswell, J. R., & Roberts, C. W. (2014). Molecular pathways: SWI/SNF (BAF) complexes are frequently mutated in cancer—mechanisms and potential therapeutic insights. *Clinical Cancer Research*, 20, 21–27.
- Watson, J. D., & Crick, F. H. (1953). Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, 171, 737–738.
- Wen, B., Wu, H., Shinkai, Y., Irizarry, R. A., & Feinberg, A. P. (2009). Large organized chromatin K9-modifications (LOCKS) distinguish differentiated from embryonic stem cells. *Nature Genetics*, 41, 246–250.
- Wiegand, K. C., Shah, S. P., Al-Agha, O. M., Zhao, Y., Tse, K., Zeng, T., Senz, J., McConechy, M. K., Anglesio, M. S., Kalloger, S. E., Yang, W., Heravi-Moussavi, A., Giuliany, R., Chow, C., Fee, J., Zayed, A., Prentice, L., Melnyk, N., Tusahvili, G., Delaney, A. D., Madore, J., Yip, S., McPherson, A. W., Ha, G., Bell, L., Fereday, S., Tam, A., Galletta, L., Tonin, P. N., Provencher, D., Miller, D., Jones, S. J., Moore, R. A., Morin, G. B., Oloumi, A., Boyd, N., Aparicio, S. A., Shih, I., Mes-Masson, A.M., Bowtell, D. D., Hirst, M., Gilks, B., Marra, M. A., & Huntsman, D. G. (2010). ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *New England Journal of Medicine*, 363, 1532–1543.
- Wilsker, D., Patsialou, A., Zumbun, S. D., Kim, S., Chen, Y., Dallas, P. B., & Moran, E. (2004). The DNA-binding properties of the ARID-containing subunits of yeast and mammalian SWI/SNF complexes. *Nucleic Acids Research*, 32, 1345–1353.

- Wu, J. N., & Roberts, C. W. (2013). ARID1A mutations in cancer: Another epigenetic tumor suppressor? *Cancer Discovery*, 3, 35–43.
- Wu, J. I., Lessard, J., & Crabtree, G. R. (2009). Understanding the words of chromatin regulation. *Cell*, 136, 200–206.
- Xu, K., Schwarz, P. M., & Ludueña, R. F. (2002). Interaction of nocodazole with tubulin isotypes. *Drug Development Research*, 55, 91–96.
- Xu, Y., & Vakoc, C. R. (2017). Targeting cancer cells with BET bromodomain inhibitors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7, a026674.
- Yamada, T., Yamaguchi, Y., Inukai, N., Okamoto, S., Mura, T., & Handa, H. (2006). P-TEFb-mediated phosphorylation of hSpt5 C-terminal repeats is critical for processive transcription elongation. *Molecular Cell*, 21, 227–237.
- Yokoyama, Y., Zhu, H., Lee, J. H., Kossenkova, A. V., Wu, S. Y., Wickramasinghe, J. M., Yin, X., Palozola, K. C., Gardini, A., Showe, L. C., Zaret, K. S., Liu, Q., Speicher, D., Conejo-Garcia, J. R., Bradner, J. E., Zhang, Z., Sood, A. K., Ordog, T., Bitler, B.G., & Zhang, R. (2016). BET inhibitors suppress ALDH activity by targeting ALDH1A1 super-enhancer in ovarian cancer. *Cancer Research*, 76, 6320–6330.
- Yanagibashi, T., Gorai, I., Nakazawa, T., Miyagishi, E., Hirahara, F., Kitamura, H., & Minaguchi, H. (1997). Complexity of expression of the intermediate filaments of six new human ovarian carcinoma cell lines: new expression of cytokeratin 20. *British Journal of Cancer*, 76, 829–835.

You, J. S., & Jones, P. A. (2012). Cancer genetics and epigenetics: Two sides of the same coin? *Cancer Cell*, 22, 9–20.

Zhang, Z., Ma, P., Jing, Y., Yan, Y., Cai, M., Zhang, M., Zhang, S., Peng, H., Ji, Z. L., Di, W., Gu, Z., Gao, W. Q., & Zhuang, G. (2016). BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy in ovarian cancer by downregulating FoxM1. *Theranostics*, 6, 219–230.

Zhao, L., & Vogt, P. K. (2008). Helical domain and kinase domain mutations in p110 α of phosphatidylinositol 3-kinase induce gain of function by different mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 2652–2657.